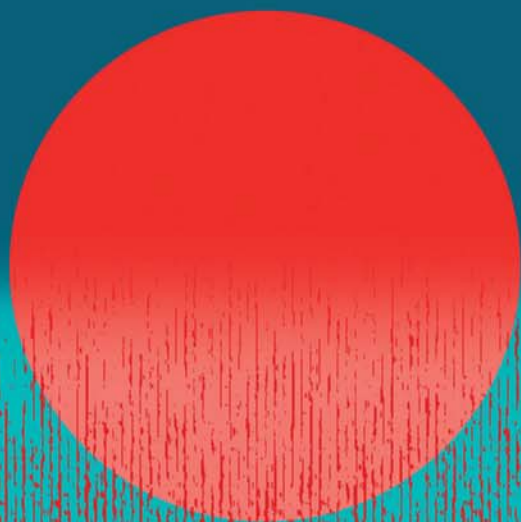


AVIS D'EXPERTS

LES NANOPARTICULES

UN ENJEU MAJEUR POUR LA SANTÉ AU TRAVAIL ?

Sous la direction de Benoît Hervé-Bazin



AVIS D'EXPERTS

Les nanoparticules

Un enjeu majeur pour la santé au travail ?

Sous la direction de Benoît HERVÉ-BAZIN

Avec la collaboration de

Denis Ambroise, Denis Bémer, Stéphane Binet, Bruno Courtois,
Bice Fubini, François Gensdarmes, Benoît Hervé-Bazin,
Marie-Claude Jaurand, Ghislaine Lacroix, Dominique Lafon,
Annie Laudet, Dominique Lison, Nicole Massin,
Frédérique Roos, Dominique Thomas, Olivier Witschger

Conception de la couverture : Éric Sault

Imprimé en France

ISBN : 978-2-86883-995-4

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés, réservés pour tous pays. La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective », et d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (alinéa 1^{er} de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du code pénal.

© EDP Sciences 2007

Avant-propos

Pourquoi un « Avis d'experts » ?

Les médias et le public se sentent directement concernés chaque fois qu'un risque nouveau apparaît ou qu'un risque ancien se révèle avoir été sous-estimé, particulièrement si sa portée est grande et si des connaissances ou des faits semblent avoir été masqués.

Il y a alors besoin, à bref délai, de fournir des informations qui répondent aux attentes et ne soient pas démenties à court terme. Ces informations doivent être compréhensibles par tous et permettre de savoir ce qui est considéré comme acquis par les scientifiques, sans cacher ce qui reste discuté ou peut rendre difficile la définition de mesures de prévention. Le public peut accepter que les scientifiques n'aient pas de réponse à toutes les questions ; il n'apprécie pas qu'on lui tienne un langage ésotérique ou qu'on lui cache la vérité. Une question peut être complexe ou incertaine au point d'être indécidable du point de vue scientifique, et le public a le droit de le savoir.

Cependant, comme l'exprimait Philippe Roqueplo¹, « Pour dépasser les problèmes posés par la constitution en catastrophe des collèges d'experts, je crois en outre qu'il faut envisager de les faire fonctionner en continu, et de les encourager à publier comme d'authentiques connaissances les conclusions auxquelles ils parviendront, quand bien

¹. Philippe Roqueplo, « Entre savoir et décision, l'expertise scientifique », INRA Éditions (1997), 147 rue de l'Université, 75338 Paris Cedex 07.

même elles demeureraient incertaines. » Il faut alors, logiquement, que se constituent des collègues capables de se saisir des problèmes « avant même qu’il devienne politiquement urgent d’intervenir », capables de travailler de façon stable et « de façon à la fois pluridisciplinaire et rigoureuse ». C’est dans cet esprit qu’a été conçue la rédaction d’avis d’experts.

Le choix d’un sujet

La première difficulté est celle du choix d’un sujet. Il est rare de pouvoir mettre en évidence et étudier un risque, nouveau ou nécessitant une mise au point réactualisée, dans de bonnes conditions. Si c’est fait trop tôt, personne n’en saisit l’intérêt ; si c’est fait trop tard, ne serait-ce qu’en raison des délais nécessaires à l’élaboration d’une réponse documentée et réfléchie – seule réponse réellement constructive – voilà les experts critiqués de toutes parts. Par ailleurs, on peut toujours craindre qu’un sujet qui devient « brûlant » soit oublié quelques jours ou quelques semaines plus tard.

En essayant de dégager des critères généraux, on peut dire que les sujets à traiter devraient *a priori* :

- répondre à des questions en émergence, ou susceptibles de devenir pressantes ;
- bénéficier de données en quantité suffisante, mais sans conclusions scientifiques entièrement stabilisées sur des points importants ;
- correspondre à de forts enjeux de prévention.

Modalités d’élaboration de l’avis d’experts

Le présent avis d’experts a été préparé, à l’initiative de l’INRS, dans le cadre d’une méthodologie validée par sa Commission scientifique. Le sujet a été approuvé par le Conseil d’administration, sur proposition motivée de la Direction scientifique.

Après constitution d’un groupe d’experts selon des critères de compétence (tels que connaissance du sujet, formation scientifique, technique ou médicale, expérience de terrain), de langue (facilités d’échanges et de déplacements) et de disponibilité concrète (permettant une participation effective à la définition et à la réalisation du projet), un avant-plan détaillé du projet a été établi, et les tâches rédactionnelles réparties en fonction des compétences, délais et disponibilités. A suivi la rédaction des parties convenues par chacun des experts ayant accepté cette responsabilité.

Les experts ne parlent qu’en leur nom propre, et non en celui de leur employeur ; ils ont la possibilité de travailler en collaboration avec d’autres experts de leur choix, mais gardent la responsabilité personnelle de leur rédaction.

La notion d'*expert indépendant* étant partiellement utopique, il a semblé utile de privilégier la transparence par les dispositions suivantes :

- chaque expert présente personnellement ses titres de compétence (par exemple : formation, parcours professionnel, expérience personnelle du sujet traité) ;
- il explicite obligatoirement ses liens avec le sujet qui ont donné, ou donnent encore, lieu à rémunération directe ou indirecte ;
- il ne s'exprime qu'à titre personnel et ne représente que lui-même ; cela lui confère à la fois responsabilité et liberté d'expression ;
- les experts participant au projet peuvent, en cas de divergence avec un point de vue présenté par l'un d'eux, rechercher si un point de vue commun peut être dégagé. Dans la négative, les points de vue différents seront présentés dans des conditions analogues (écrits et accompagnés d'une bibliographie), intégrés au projet final et clairement identifiés.

Pourquoi prévoir de telles dispositions ? Il faut prendre conscience que « L'expertise exige des scientifiques qu'ils expriment des convictions qui vont bien au-delà de leur savoir »², et que c'est cette distance entre expertise et science qui leur permet de s'engager dans une aventure collective sans risquer une mise en cause de leur compétence ou de leur probité personnelles. De plus, la confrontation d'experts de cultures différentes apporte à l'administration qui peut avoir à prendre des décisions, des éclairages différents, « susceptibles de justifier des orientations politiques elles-mêmes différentes »³ et peut l'amener à nuancer ou à réviser des orientations décisionnelles déjà quasi élaborées.

La réalisation de cet avis a montré que ces dispositions sont sans doute trop théoriques. Il conviendra donc de les affiner ou de les modifier en privilégiant la clarté des choix effectués.

Statut et diffusion du document

Ce document, préparé par l'INRS, présente donc un « Avis d'experts » qui n'est pas nécessairement son point de vue officiel, mais une mise au point dont il a pris l'initiative, à laquelle il a participé, et à laquelle il a apporté son soutien logistique. Il s'agit, en définitive, d'un document d'information qui peut servir de base de travail et/ou de décision à tous ceux qui désirent l'utiliser à leurs fins propres, à seule charge pour ces derniers de citer leurs sources.

². *Ibid.*

³. *Ibid.*

Des diffusions spécifiques, adaptées aux milieux intéressés, pourront être préparées par l'INRS ou par d'autres, en fonction des besoins. Elles feront obligatoirement référence au document final intégral.

Après adoption formelle du document final, l'INRS organise si nécessaire une conférence de presse, à laquelle tous les experts ayant participé au projet sont invités.

B. HERVÉ-BAZIN

Si, après lecture attentive de cet « Avis d'experts », vous avez des remarques ou suggestions à faire, merci de les faire parvenir à :

Benoît Hervé-Bazin
Direction scientifique, chargé de mission
Avenue de Bourgogne
54501 VANDŒUVRE Cedex

Préambule

Issues des microtechnologies, les nanotechnologies représentent aujourd'hui un enjeu économique majeur pour les sociétés développées. Elles permettent des innovations de rupture dans différents domaines : santé, énergie, information, transports...

Ce constat explique sans doute pourquoi l'Europe, les États-Unis et le Japon consacrent chacun environ un milliard d'euros par an à la recherche et au développement dans ce domaine porteur. C'est devenu un élément de performance et de compétitivité.

Emportés par l'élan, par la faible culture de nombre de milieux de la recherche pour la sécurité, et par la compétition, des financements ont surtout été orientés vers l'application. Retour classique de balancier, l'irrationnel et la peur viennent ternir le bel enthousiasme pour un futur enfin radieux ! Il est vrai que, sur un tel sujet, les connaissances des dangers pour l'homme sont très lacunaires, et donc qu'il est possible de perturber l'opinion du public ! C'est dans ce contexte que l'on a pu observer des médiatisations dont les fondements scientifiques faisaient plutôt défaut.

L'INRS, chargé d'agir pour l'amélioration des conditions de travail et la prévention des risques professionnels, a fondé sa légitimité sur la qualité de ses recherches et de ses expertises scientifiques. Il est en effet important d'asseoir ses avis sur l'existant validé : c'est la raison qui nous a amenés à demander à Benoît Hervé-Bazin, chargé de mission à la Direction scientifique de l'INRS, un récidiviste (*cf.* « Le risque cancérogène du plomb – Évaluation en milieux professionnels » – EDP Sciences, 2004), d'animer une réflexion scientifique sur les nanomatériaux, ou plutôt sur les particules ultra-fines, en termes de risques pour les opérateurs.

Ce travail d'expertise scientifique vraie ne définit pas la position de l'INRS, mais constitue un document de référence qui, compte tenu des évolutions, va vieillir vite ; en tout cas, c'est un souhait, parce que l'on aura pris en considération une nécessaire recherche permettant de combler les lacunes les plus criantes...

Pour le réaliser, Benoît Hervé-Bazin s'est entouré d'experts scientifiques d'horizons différents, permettant la couverture optimale du sujet. Cette référence n'est pas un but en soi mais oblige à se poser les bonnes questions au moment où certains souhaitent définir des bonnes pratiques sans support scientifique, proposer des normes « acceptables » ne s'appuyant pas sur du solide....

Merci donc à toute l'équipe qui nous fait rentrer dans le nanomonde en examinant les dangers qu'il est susceptible de créer si l'on n'y prend garde.

J.-C. ANDRÉ
Directeur scientifique de l'INRS

Table des matières

Avant-propos	3
Préambule	7
Les auteurs	16
Introduction	19
1. Pourquoi choisir « les particules ultra-fines » ?	19
1.1. Une question en émergence	20
1.2. Des données nombreuses, mais de grandes zones d'ombre...	23
1.3. Des enjeux très importants pour la prévention	27
2. Pourquoi un tel intérêt pour les particules ultra-fines ?	29
3. Portée, limites et organisation de l'ouvrage	32
3.1. Définition des particules ultra-fines (PUF)	32
3.2. Sélection et analyse des références	33
3.3. Plan de l'ouvrage	34
3.4. Conseils et avertissements finaux	35
Bibliographie	36
Chapitre 1. Généralités sur les particules ultra-fines	45
1. Définition d'un aérosol ultra-fin	45
Bibliographie	48
2. Comportement physique des particules ultra-fines (PUF)	49
Introduction	49
2.1. Domaine moléculaire	49

2.2. Mouvement des particules	52
2.3. Coagulation des particules	60
2.4. Les phénomènes de nucléation, d'évaporation et de condensation	63
2.5. Dépôt des particules	65
Conclusion	69
Bibliographie	70
3. Filtration des aérosols	72
Introduction	72
3.1. Efficacité d'un filtre et de ses facteurs	73
3.2. Évolution des performances du filtre au cours du colmatage	82
3.3. Équipements de protection respiratoire	84
Conclusion	86
Bibliographie	87
4. Généralités sur les propriétés de surface	89
4.1. Rôle de la surface dans les interactions particules/matière vivante	89
4.2. Évaluation de la surface	91
4.3. Propriétés de surface impliquées dans la réponse biologique	92
4.4. Particularités des PUF par rapport aux particules micrométriques	93
4.5. Agglomération des particules	93
Bibliographie	94
5. Aperçus pour quelques autres propriétés	95
5.1. Solubilité	95
5.2. Agrégation/désagrégation	97
5.3. Translocation et taille	101
Chapitre 2. Caractérisation et sources des aérosols ultra-fins	105
1. Caractérisation physique des particules ultra-fines	105
1.1. Paramètres pour la caractérisation physique des particules (taille, forme, quantité)	106
1.2. Méthodes de caractérisation des particules ultra-fines dispersées dans l'air	118
1.3. Éléments pour la caractérisation de l'exposition professionnelle	135
Conclusion	139
Bibliographie	139
2. Aérosols ultra-fins dans l'environnement	143
Introduction	143
2.1. Sources de particules dans l'atmosphère	143
2.2. Granulométrie de l'aérosol atmosphérique	146
2.3. Évolution de l'aérosol atmosphérique	149
2.4. Cas particuliers d'aérosols ultra-fins dans l'atmosphère	151
Conclusion	154
Bibliographie	154
3. Aérosols ultra-fins en milieux professionnels	157
Introduction	157

3.1. Catégories et terminologie	161
3.2. Émissions secondaires liées à certains procédés industriels	162
3.3. Fabrication et manipulation de matériaux connus à structure nanométrique	176
3.4. Fabrication et manipulation de nouveaux matériaux (nanomatériaux)	181
Conclusion	185
Bibliographie	186
Chapitre 3. Voies de pénétration dans l'organisme	191
1. Inhalation et dépôt dans les voies respiratoires	191
1.1. Voies respiratoires	192
1.2. Inhalation des particules	195
1.3. Dépôt des particules inhalées	196
Conclusion	215
Bibliographie	215
2. Clairance pulmonaire. Distribution et devenir dans l'organisme	217
2.1. Tractus respiratoire supérieur	218
2.2. Arbre trachéobronchique	218
2.3. Région alvéolaire	218
2.4. Distribution et translocation	221
Bibliographie	225
3. Particules ultra-fines et pénétration par la voie cutanée	229
3.1. Dioxyde de titane TiO_2	231
3.2. Oxyde de zinc ZnO	235
3.3. Données de pénétration cutanée relatives à d'autres PUF	237
3.4. Aperçu synthétique des publications	240
3.5. Discussion	243
Conclusion	247
Bibliographie	249
4. Pénétration au cerveau par la voie nasale	257
Introduction – Le passage d'espèces chimiques vers le cerveau	257
4.1. Passage d'éléments métalliques dans l'encéphale – Cas du manganèse (résumé)	261
4.2. Passage d'autres espèces chimiques au cerveau <i>via</i> les fosses nasales	267
4.3. Discussion	273
Conclusion	277
Bibliographie	277
Chapitre 4. Données de toxicologie issues de l'environnement	283
1. Études expérimentales (domaine de l'environnement)	283
Introduction	283
1.1. Toxicologie de la pollution atmosphérique particulaire globale (PM_{10} et $\text{PM}_{2,5}$)	285
1.2. Fraction ultra-fine de la pollution particulaire	296

Conclusion générale	299
Bibliographie	300
2. Études épidémiologiques des effets sur la santé des particules ultra-fines environnementales	306
Introduction	306
2.1. Types d'études	306
2.2. Principaux résultats des études portant sur les fractions particulières PM ₁₀ et PM _{2,5}	307
2.3. PUF et études épidémiologiques	309
Synthèse	319
Bibliographie	321
Annexe – Tableaux de synthèse	323
3. Données humaines en conditions d'exposition contrôlée	325
3.1. Contexte	325
3.2. Études de dosimétrie	327
3.3. Essais cliniques (effets inflammatoires dus à l'inhalation de PUF)	332
3.4. Discussion et conclusion	337
Bibliographie	340
4. Pollution particulaire environnementale, particules ultra-fines et cancer	342
Bibliographie	345
Chapitre 5. Quelques cas concrets (1) : oxydes simples ou complexes	349
1. Oxyde de zinc	350
Bibliographie	354
2. Dioxyde de titane	355
2.1. TiO ₂ non ultra-fin (rappels résumés)	356
2.2. TiO ₂ ultra-fin (seul ou en comparaison)	359
Conclusion	373
Bibliographie	375
3. Silices amorphes	379
Introduction	379
3.1. Silices amorphes synthétiques	380
3.2. Silices amorphes sous-produits de la métallurgie (fumées de silice)	383
3.3. Propriétés toxicologiques expérimentales des silices amorphes	385
3.4. Données toxicologiques rapportées chez l'homme	397
Conclusion	402
Bibliographie	403
4. Fumées de soudage	407
Introduction	407
4.1. Effets sur la santé humaine	410
4.2. Données expérimentales	415
Discussion	418
Conclusion	420
Bibliographie	421

Chapitre 6. Quelques cas concrets (2) : particules à base de carbone	423
1. Toxicité des particules ultra-fines de noirs de carbone (Cas n° 1333-86-4)	423
1.1. Définition et structure physicochimique	423
1.2. Production	424
1.3. Propriétés chimiques et physiques	425
1.4. Niveaux d'exposition atmosphérique en milieux de travail	427
1.5. Propriétés toxicologiques des noirs de carbone	428
1.6. Toxicité du noir de carbone ultra-fin	432
1.7. Toxicocinétique et biodisponibilité	444
Conclusion	444
Bibliographie	446
2. Pollution particulaire diesel et toxicité	449
2.1. Généralités sur les émissions diesels	449
2.2. Toxicologie de la pollution particulaire diesel	452
Conclusion	465
Bibliographie	466
3. Fullérènes	472
3.1. Nature	472
3.2. Production	473
3.3. Propriétés physicochimiques	474
3.4. Utilisations	475
3.5. Propriétés toxicologiques	475
Commentaires	480
Bibliographie	482
4. Nanotubes de carbone	485
4.1. Nature, production, utilisations	486
4.2. Toxicité <i>in vitro</i>	487
4.3. Toxicité cutanée et oculaire	489
4.4. Toxicité pulmonaire	490
Conclusion	494
Bibliographie	495
Chapitre 7. Discussion (1).	
Particules ultra-fines : propriétés physicochimiques et activité biologique	499
1. Propriétés de surface et réactivité des PUF	499
1.1. Rôle de la surface dans la génération des radicaux libres	499
1.2. Rôle des propriétés de surface dans l'interaction avec des macromolécules biologiques	506
1.3. Effet des dimensions des particules dans l'interaction avec les cellules et dans l'adsorption des protéines	514
1.4. Rôle de la surface spécifique des PUF sur l'intensité et la spécificité de la réponse biologique	517
Bibliographie	522

2. Étude critique du rôle des paramètres physiques dans l'activité biologique	530
Introduction	530
2.1. Contexte des études toxicologiques visant à déterminer les paramètres des PUF pertinents pour l'évaluation de leurs effets physiopathologiques	531
2.2. Bilan des données expérimentales sur le(s) paramètre(s) les plus représentatifs de l'effet observé (rôle de la surface, de la masse, du nombre)	534
2.3. Données expérimentales sur le rôle des radicaux libres	548
2.4. Commentaires sur les critères d'évaluation des dommages biologiques potentiels utilisés dans les différentes études	551
Bibliographie	555

Chapitre 8. Discussion (2).

Paramètres chimiques de la toxicité des particules ultra-fines 561

1. Rôle des substances adsorbées	561
Introduction générale sur les propriétés physicochimiques des particules	561
1.1. Rôle des constituants chimiques adsorbés dans la toxicité des particules	563
1.2. Rôle du corps de la particule <i>versus</i> les composés chimiques adsorbés	567
Conclusion	568
Bibliographie	569
2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques adsorbés	572
2.1. Contexte	572
2.2. Caractérisation physicochimique des particules carbonées	574
2.3. Cinétique et métabolisme (homme et animaux)	575
2.4. Études expérimentales sur le rôle des HAP dans les effets physiopathologiques des particules de carbone	581
Conclusion	584
Bibliographie	587
3. Part des métaux dans la toxicité des particules	591
Bibliographie	596
4. Nature de la substance	598
Bibliographie	602
5. Particules microniques et particules ultra-fines du même matériau : quels changements ?	604
5.1. Aspects toxicocinétiques	605
5.2. Aspects toxicodynamiques	607
Bibliographie	609

Chapitre 9. Discussion (3) et conclusions 615

1. Quelle applicabilité de ces connaissances à l'homme ?	615
1.1. Contexte	615
1.2. Éléments du dossier	616
1.3. Applicabilité et prévention	622
Conclusion	626
Bibliographie	627

2. Quelles mesures de prévention définir ou envisager ?	630
Introduction : mesures générales de prévention (VDI, 2004)	630
2.1. Mesures générales de prévention sur les lieux de travail	632
2.2. Risques d'incendie ou d'explosion	634
Bibliographie	634
2.3. Filtration et prévention	635
2.4. Valeurs limites d'exposition professionnelle	635
Bibliographie	651
Conclusions générales	657
1. Dangers et risques présentés par les particules ultra-fines : synthèse et questionnements	657
1.1. Définition des PUF et contexte de cet ouvrage	657
1.2. Pénétration des PUF dans l'organisme	658
1.3. Synthèse et discussion sur les déterminants de la toxicité des PUF	660
1.4. Quelles mesures de prévention, de précaution ?	667
1.5. Quelles pistes de recherche ?	668
1.6. Observations finales	669
Bibliographie	669
2. Conclusions et recommandations du groupe de travail	671
2.1. Contexte d'ensemble	671
2.2. Identification des nanoparticules	672
2.3. Suivi des nanoparticules (« traçabilité »)	672
2.4. Métrologie	672
2.5. Risques toxicologiques	673
2.6. Prévention, précaution	673
2.7. Besoins de recherches	674
3. Pistes de recherches en hygiène et sécurité au travail	674
3.1. Améliorer la connaissance des procédés de fabrication et des produits fabriqués	675
3.2. Améliorer nos capacités métrologiques et nos connaissances techniques	675
3.3. Développer les connaissances toxicologiques	676
3.4. Développer des mesures de prévention adaptées aux PUF	679
3.5. Optimiser nos stratégies de résolution de difficultés	680
Bibliographie	681
Annexe – Quelques rapports sur les nanoparticules	683
Table des abréviations	686
Glossaire	689

Les auteurs

■ Denis AMBROISE

Épidémiologiste à l'INRS (Vandœuvre).

■ Denis BÉMER

Responsable d'étude à l'INRS.

■ Stéphane BINET

Pharmacien-toxicologue à l'INRS (Vandœuvre), spécialisé en cancérogenèse expérimentale et valeurs limites d'exposition professionnelle.

■ Bruno COURTOIS

Ingénieur chimiste à l'INRS (Paris).

■ Bice FUBINI

Professeur de chimie à la faculté de pharmacie, et directeur du « Centre interdépartemental pour les études sur les amiantes et autres particules toxiques » (G. Scansetti), université de Turin, Italie.

■ François GENSDARMES

Docteur en sciences des aérosols. Ingénieur de recherche à l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN).

■ Benoît HERVÉ-BAZIN

Ingénieur chimiste à l'INRS (Vandœuvre) – Chargé de mission à la Direction scientifique.

■ Marie-Claude JAURAND

Directeur de recherche à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM – Créteil).

■ Ghislaine LACROIX

Docteur en toxicologie à l'Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS – Creil) – Spécialisée dans l'étude des effets des polluants atmosphériques sur la santé.

■ Dominique LAFON

Médecin toxicologue à l'INRS (Paris).

■ Annie LAUDET

Toxicologue à l'INRS (Paris).

■ Dominique LISON

Professeur à l'Université catholique de Louvain (Bruxelles, Belgique). Faculté de médecine, Unité de toxicologie industrielle et de médecine du travail.

■ Nicole MASSIN

Médecin épidémiologiste à l'INRS (Vandœuvre).

■ Frédérique ROOS

Médecin toxicologue à l'INRS (Paris).

■ Dominique THOMAS

Professeur à l'université Henri Poincaré – Nancy I – Spécialisé en filtration des aérosols.

■ Olivier WITSCHGER

Docteur en sciences des aérosols. Ingénieur de recherche au département de Métrologie des polluants de l'INRS (Vandœuvre).

Avec l'assistance de :

■ Claudine CÉRICOLA

Secrétaire à l'INRS, département direction scientifique (Vandœuvre).

Remerciements aux auteurs

Tout d'abord, je tiens à remercier ceux de mes collègues de l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS) qui ont accepté de prendre le risque de participer à la rédaction de cet « avis d'experts », d'une part sans trop savoir où nous allions vraiment – car on ne le sait que quand le travail est achevé – et d'autre part malgré leur connaissance de mes défauts, vite repérés chez ceux que l'on côtoie. L'un d'eux est d'être, comme on dit, de « l'ancienne école », c'est-à-dire une école d'exigence, de rigueur, de respect des délais, toutes choses qui ont toujours été difficiles à accepter. Car cela sous-entend relances, relectures, questionnements, justifications, retouches, ajouts de nouvelles publications, etc. Plusieurs ont accepté avant d'avoir eu le temps d'examiner vraiment les données relatives au sujet précis – mais pas nécessairement simple – qui leur était proposé. Les mauvaises langues y verraient de l'inconscience, j'y vois du courage et de la confiance. Un grand merci, donc, ainsi qu'à ma hiérarchie, qui m'a toujours soutenu dans la durée, y compris aux moments un peu plus difficiles.

Mes remerciements sont, pour les experts externes à notre Institut, empreints d'une même reconnaissance. Car comment peut-on accepter de travailler avec et, d'une certaine façon, pour quelqu'un que l'on ne connaît pas vraiment, surtout quand on a déjà du travail et des projets par-dessus la tête, et un savoir et une expérience qui seraient peut-être mieux valorisés ailleurs ? Pourtant, je n'ai reçu, dès le début, que des réponses positives, dans lesquelles je vois une certaine confiance et un grand intérêt pour la thématique proposée. Non seulement ces experts ont largement fait leur part de travail, mais ils l'ont fait avec conscience, compétence et rapidité. Ce livre leur doit une valeur ajoutée inestimable, et je les en remercie chaleureusement.

À tous et à chacun je dédie cet ouvrage.

B. HERVÉ-BAZIN

Introduction

B. Hervé-Bazin

1. Pourquoi choisir « les particules ultra-fines » ?

Depuis longtemps, on sait que la pollution atmosphérique peut tuer ; plusieurs épisodes l'ont rappelé au vingtième siècle, par exemple le fameux épisode du « smog » de décembre 1952 à Londres, lequel a provoqué, en quatre jours, de l'ordre de 4 000 décès de plus qu'attendu dans les conditions usuelles. La recherche et l'étude de corrélations entre décès ou morbidité et variations de concentrations de particules (évaluées en fumées noires) ou de dioxyde de soufre ont indiqué la très probable responsabilité de ces agents et constitué un premier lien entre exposition à des particules fines ou ultra-fines et effets sur la santé humaine, à l'origine de la fixation d'une valeur limite environnementale pour les particules fines par l'EPA en 1987 (POST, 1996). Les recherches ont progressé depuis, dans le domaine environnemental, tant en extension (dans de nombreux pays) qu'en performances techniques (nombre et qualité des mesurages, méthodes de dépouillement statistique). Or, bien que des particules fines ou ultra-fines aient été présentes sur les lieux de travail depuis toujours, l'intérêt à leur égard, ainsi que les recherches méthodologiques ou toxicologiques, sont restés limités. Actuellement, la naissance partout saluée des « nanotechnologies » et autres « nanoparticules », et leur développement très rapide, ont provoqué des réactions d'inquiétude devant des risques qui semblaient nouveaux, en tout cas mal connus.

On peut se demander – s’il est vrai que le risque existe depuis toujours sur les lieux de travail et ne s’est pas massivement traduit par des maladies, plaintes ou absentéisme – s’il n’y a pas de question plus prioritaire. C’est peut-être le cas, mais il semble difficile, sinon impossible, de fixer des critères définitifs de priorité. Nous choisissons de dire pour notre part que les sujets à traiter devraient *a priori* :

- répondre à des questions en émergence, ou susceptibles de devenir pressantes ;
- bénéficier de données en quantité suffisante, mais sans conclusions scientifiques entièrement stabilisées sur des points importants ; pour le dire autrement, il reste à répondre à des questions ouvertes d’importance sur le plan technique ou scientifique ;
- correspondre à de forts enjeux de prévention.

Il nous semble que le sujet des particules ultra-fines répond bien à de tels critères. Nous essayons de le montrer ci-après.

1.1. Une question en émergence

C’est la parution d’articles dans différents médias (quotidiens nationaux, notamment, mais aussi toute presse à grand tirage), surtout s’ils semblent alarmistes ou polémiques, qui marque l’émergence d’une question pour le public. Ainsi, parmi d’autres exemples, le quotidien *Le Figaro* titrait en gros caractères, le 7 mai 2004 : « Les particules fines tueraient plus de 6 000 Français par an ». L’article principal se référait au rapport de l’AFSSE qui venait de paraître et, à travers ce dernier, « à la pollution atmosphérique urbaine liée pour une bonne part aux rejets polluants des véhicules ». Et de souligner : « avec pour conséquence une augmentation mesurable des décès par cancer du poumon et par maladies cardiorespiratoires chez les plus de 30 ans ». Sur la même page, un autre article mettait nettement en accusation, à travers les déclarations d’un ancien ministre de l’environnement, la pollution (notamment particulaire) par les moteurs diesels et le « pouvoir délirant » du « lobby automobile ». Sans s’attarder sur les particularités inhérentes au style journalistique, cette prise de conscience du risque par la population générale semble bien provenir de nombreuses études épidémiologiques nationales et internationales (par exemple : Atkinson et coll., 1999 ; Dockery et coll., 1993 ; Pope et coll., 1991, 1995, 2002), dont l’impact a été considérable (nombreuses citations, multiplication de publications similaires). *A contrario*, bien que quasiment simultanée, la prise de conscience d’un risque grâce aux travaux de toxicologie expérimentale était restée discrète, malgré des publications également nombreuses et solides (Ferin et coll., 1990, 1991 ; Oberdörster et coll., 1990 ; Oberdörster et Yu, 1990 ; et bien d’autres), et en dépit d’efforts pour alerter l’opinion, y compris lors de congrès internationaux (Oberdörster et coll., 1991). Oberdörster – l’un des meilleurs spécialistes mondiaux de la pollution particulaire dans le domaine expérimental – et Utell soulignent même qu’ils

avaient explicitement proposé en 1994 l'hypothèse d'une nocivité spécifique des particules ultra-fines lors du premier colloque « Pollution particulaire, morbidité et mortalité », à Irvine (Californie), et s'étaient alors heurtés « à un amical scepticisme autant qu'à de franches oppositions » (Oberdörster et Utell, 2002). Ceci n'avait nullement empêché Oberdörster et coll. (1995) de continuer à tenter d'attirer l'attention sur ce thème, sans succès apparent puisque, au contraire, ce sont les données d'origine environnementale qui ont influencé les choix des conditions expérimentales (par exemple effectuées sur des rongeurs âgés et/ou affaiblis, par analogie avec certaines tranches de la population générale ; Elder et coll., 2004a, 2004b ; Gardner et coll., 2004 ; Last et coll., 2004 ; Wichers et coll., 2004a, 2004b).

La pollution particulaire émise par les moteurs diesels avait depuis longtemps retenu l'attention des milieux scientifiques et parfois des médias, là encore en raison d'études épidémiologiques aux conclusions discutées (Gamble, 1998 ; Mauderly, 2001 ; Valberg, 2004), voire nettement contestées (Bunn et coll., 2002 ; Lieberman, 2003 ; Jones et Lieberman, 2004). Celles-ci pointaient un risque de cancer du poumon (voir par exemple EPA - IRIS, 2003 ; AFSSE, 2003 ; Bhatia et coll., 1998). Mais, si le rôle des particules fines et ultra-fines avait été envisagé – sans être pour autant confirmé ; voir Oberdörster et Yu, 1990 – ce thème n'avait pas été dégagé en tant que tel (EPA, 1998 ; Tissot, 1999) : il est né de certaines interprétations des résultats d'études épidémiologiques relatives aux effets de la pollution environnementale, d'abord isolées (Burnett et coll., 1995 ; Schwartz et coll., 1996 ; Peters et coll., 1997a, 1997b) puis confortées par de nombreuses études épidémiologiques internationales, et finalement pratiquement admises (Donaldson et coll., 1998 ; Wichmann et coll., 2000 ; Ibaldo-Mulli et coll., 2002 ; de Hartog et coll., 2003 ; Englert, 2004), même si les mécanismes d'action sont encore loin d'être compris dans leur ensemble.

Le surgissement des « nanotechnologies »

D'autres aspects contribuent à sensibiliser le public au thème des particules ultra-fines. Notamment, le bouillonnement d'initiatives, de nouveautés, et d'espoirs multiples que soulève ce qui a été nommé « nanotechnologie », que l'écho en soit perceptible sur Internet, à travers les innombrables projets ou réalisations (laboratoires de recherche dédiés, formulations en tous types de la chimie à l'électronique en passant par la cosmétique, colloques ou symposiums, rapports d'institutions officielles, la recherche militaire [Altmann, 2004 ; Ibrügger, 2001], le 6^e programme cadre de recherche et développement de l'Union européenne [CE FP6, 3^e priorité thématique], etc.), ou encore les budgets impressionnants qui y sont consacrés dans le monde (à commencer bien entendu par les États-Unis, mais aussi l'Europe ou le Japon). Du seul point de vue budgétaire, par exemple, le mouvement national pour la nanotechnologie (National Nanotechnology Initiative) aux États-Unis a démarré en 2000 avec un

budget de 270 millions de dollars ; il a approché le milliard de dollars en 2005. La recherche mondiale consacrait à la question moins de 500 millions de dollars en 1997 ; elle a dépassé les 3,5 milliards en 2004. Les États-Unis ont fondé 22 centres de recherche en nanotechnologies depuis 1991, et 775 compagnies ou organisations y sont impliquées, petites structures (Nanoproducts, Nanophase, Altair, etc.) comme grandes sociétés (DuPont, BASF, L'Oréal, General Electric, Saint Gobain, Lucent, Philips, Matshushita, Mitshubishi, Intel, Advanced Micro Devices, Merck, Hewlett-Packard, IBM, etc.). Selon un communiqué de presse daté du 25 septembre 2004 (S&T Presse, 2004), le National Cancer Institute a annoncé la mise en place d'un programme de 144 millions de dollars sur cinq ans, destiné à développer l'emploi des nanotechnologies dans la lutte contre le cancer. L'objectif est de mettre au point, à l'échelle de la molécule, des structures capables de détecter et de détruire les cellules cancéreuses ; aux États-Unis, différentes approches sont en cours d'évaluation, parmi lesquelles trois sont considérées comme particulièrement prometteuses par certains médecins. Par ailleurs, plus de 130 produits utilisant des nanotechnologies seraient déjà sur le marché (Service, 2004). De nombreux sites Internet en font état (voir, parmi bien d'autres, <http://www.azonano.com>) et permettent de réaliser à quel point ces techniques font déjà partie de notre vie, presque à notre insu. « À titre d'information, STMicroelectronics incorpore des nanostructures pour plus de 80 % de sa production de circuits intégrés, ce qui représente près de 8 000 emplois en France » (Gouzènes, 2004). Dans la branche « chimie », de très nombreux laboratoires, instituts de recherche, universités, start-ups et autres structures fabriquent et/ou manipulent déjà des particules ultra-fines. Ceci, sans oublier des applications anciennes telles que noirs de carbone, silices précipitées, oxydes de cérium, de titane ou de zinc (voir Chopin, 2004). Tout ceci fait que la conscience d'un risque, non émergée tant qu'on le pensait « cantonné » au monde de la recherche ou du travail, est apparue relativement brusquement, indépendamment des connaissances acquises dans le monde scientifique et technique ; d'où la question, en-tête de l'article déjà cité de Service (2004) : « L'évolution dans ce domaine est-elle si rapide que nous courrions le risque de répéter les erreurs qui ont accompagné les précédentes révolutions technologiques ? »

L'inquiétude diffuse ainsi exprimée, les appels à une plus grande prudence, les réflexions de sociétés d'assurance ou de réassurance, ou encore les oppositions parfois tranchées que cette évolution provoque, parfois amplifiées par les médias, montrent que la question des particules ultra-fines est maintenant consciemment posée. On peut même affirmer qu'il s'agit non plus d'une question en émergence, mais d'une question émergée, à laquelle il faut apporter des réponses autant que faire se peut, avant que les réticences ou les oppositions ne rendent impossible tout progrès légitime, en raison de risques mal appréciés parce que mal connus, mal compris, et parfois mal maîtrisés.

1.2. Des données nombreuses, mais de grandes zones d'ombre...

Nous l'avons dit, un volet des connaissances relatives aux risques de l'exposition aux particules fines et ultra-fines est issu d'études épidémiologiques menées dans l'environnement. Pour aider à mieux en saisir le contexte et les modalités, nous présentons brièvement, parmi de nombreux exemples, l'étude coordonnée au niveau européen dite APHEIS (Air Pollution and Health: a European Information System ; APHEIS 2004).

La pollution de l'air reste un problème de santé publique en Europe. Cette situation a conduit à la création du programme APHEIS en 1999, afin de fournir aux décideurs européens, aux professionnels de l'environnement et de la santé, aux médias et au grand public, des informations sur la pollution de l'air et la santé publique. Un réseau de surveillance épidémiologique de l'impact sanitaire de la pollution atmosphérique a été mis en place à travers l'Europe. Au cours de la première année (1999-2000), APHEIS a pu définir les meilleurs indicateurs à utiliser pour la surveillance épidémiologique et les évaluations d'impact sanitaire (EIS), et identifier les instances les mieux placées pour mettre en œuvre le système de surveillance dans 26 villes de 12 pays européens.

Dans les 19 villes européennes (soit environ 32 millions d'habitants) mesurant les PM_{10} (particules de tailles inférieures à $10\ \mu m$), l'évaluation de l'impact sanitaire (EIS) estime à 5 547 (la fourchette variant entre 3 235 et 7 439) les décès qui pourraient être évités chaque année si, toutes choses égales par ailleurs, l'exposition à long terme aux concentrations ambiantes de PM_{10} était réduite de $5\ \mu g/m^3$. Au moins 15 % de ces décès constituent l'impact à court terme de la pollution atmosphérique dans ces villes. Si l'on choisit comme indicateur de pollution les fumées noires dans les 15 villes qui les mesurent (soit presque 25 millions d'habitants), l'EIS à court terme estime que, toutes choses égales par ailleurs, 577 décès anticipés (la fourchette variant entre 337 et 818) pourraient être évités chaque année par une réduction de $5\ \mu g/m^3$ des concentrations ambiantes. La faible valeur des risques au plan individuel (relativement à d'autres risques) ne doit pas occulter le fait que toute la population est exposée. Ainsi, des modifications mêmes mineures des niveaux de pollution atmosphérique peuvent avoir un impact non négligeable sur la santé publique.

Note. S'appuyant sur les résultats des études épidémiologiques, conduites dans des contextes très variés et au sein de populations différentes dans diverses parties du monde, la Communauté européenne (CE, 1999) a défini pour les PM_{10} les limites suivantes, qualifiées d'exigences minimales, applicables à compter du 1^{er} janvier 2005 :

- $50\ \mu g/m^3$ en moyenne sur 24 heures, à ne pas dépasser plus de 35 fois par an ;
- $40\ \mu g/m^3$ en moyenne annuelle.

Ces valeurs deviendraient respectivement (sous réserve de confirmation) $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à ne pas dépasser plus de 7 fois par an, et $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$, à compter du 1^{er} janvier 2010.

Ces EIS sont cohérentes avec d'autres similaires. Pour permettre de comparer les résultats entre les 26 villes participantes, une méthode standardisée s'appuyant sur les recommandations de l'OMS a été appliquée. L'analyse a été limitée aux PM_{10} et aux fumées noires parmi les différents indicateurs de pollution possibles, par exemple l'ozone. Par ailleurs, comme le niveau d'exposition de référence utilisé pour le calcul de l'impact sanitaire influence fortement les résultats, les calculs ont été réalisés pour une gamme de plusieurs niveaux de référence dans différents scenarii.

Concernant l'exposition à long terme à la pollution atmosphérique, la fonction exposition-risque utilisée dans l'EIS réalisée en Autriche, France et Suisse, basée sur deux études de cohorte américaines réanalysées par le Health Effects Institute, a été sélectionnée. La validité d'une telle transposition reste une question ouverte, car la composition des particules et les caractéristiques des populations peuvent différer entre les deux continents. Cependant, une étude néerlandaise montre que les résultats européens sont très proches de ceux des études américaines. Les études de cohorte évaluent l'augmentation de l'espérance de vie à environ une année par individu en moyenne sur l'ensemble de la population dans les villes moins polluées comparées aux villes plus polluées.

Il est envisagé de mieux coordonner APHEIS avec d'autres programmes tels que NEHAPs (National Environmental Action Plans), le réseau européen Airnet et le programme CAFE (Clean Air for Europe), pour partager méthodes et résultats.

La continuation de ce programme a inclus de nouvelles données, entre autres pour les $\text{PM}_{2,5}$, examiné certaines causes spécifiques de mortalité (cardiovasculaire, cancer pulmonaire, maladies respiratoires), et évalué les gains potentiels d'espérance de vie consécutifs à la diminution de la pollution (<http://www.apheis.net/pages/NewsTest1.html>). APHEIS-3 a estimé que 11 375 décès prématurés (respectivement 16 926), dont 8 053 par maladie cardiovasculaire et 1 296 cancers pulmonaires (respectivement 11 612 et 1 901), pourraient être évités par une réduction à $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (respectivement $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$) des niveaux de $\text{PM}_{2,5}$ dans chaque ville. Toutes choses égales par ailleurs, et dans la mesure où les $\text{PM}_{2,5}$ n'excéderaient pas $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne annuelle, l'espérance de vie d'une personne de 30 ans serait améliorée en moyenne entre 2 et 13 mois.

Si cet aperçu permet de concrétiser un peu les orientations et les méthodes des travaux environnementaux, il laisse des questions pour lesquelles la population générale ne perçoit pas de réponse clairement affichée, comme : comment peut-on attribuer de façon sûre un rôle particulier aux particules ultra-fines, dans la mesure où les polluants gazeux qui les accompagnent en général (dioxyde de soufre, ozone, oxydes d'azote, oxyde de carbone...) présentent des variations de concentrations quasi simultanées ? Ne pourrait-il

y avoir des interactions entre les différents polluants ? Certains types de particules pourraient-ils être plus toxiques que d'autres ? Comment peut-on mettre à profit ces connaissances avec leurs incertitudes ou insuffisances au monde de la recherche et, surtout, de la production industrielle puisque, *a priori*, on n'y trouve ni les mêmes polluants, ni les mêmes conditions d'exposition, ni les mêmes populations ?

Ces questions montrent qu'il est utile, sans reprendre le détail des innombrables travaux réalisés dans le domaine environnemental – ce qui ne peut être l'objet d'une expertise ciblée sur le monde professionnel – d'en analyser les acquis pour discerner ce qui peut en être valablement utilisé.

Quels facteurs sont les plus importants pour la toxicité ?

Par ailleurs, nous l'avons rapidement évoqué, beaucoup d'efforts ont été consacrés à caractériser les effets sur l'homme de la pollution particulaire émise par les moteurs diesels, laquelle constitue d'ailleurs une composante variable, mais souvent non négligeable, de la pollution urbaine en particules fines et ultra-fines. Il est donc utile, là encore, d'en rappeler les acquis comme les limites. Enfin, des travaux expérimentaux ont été effectués avec diverses particules fines et ultra-fines, tirées ou non du monde de l'environnement, et ils devraient, même incomplets, permettre d'enrichir et de nuancer l'ensemble des acquis précédents.

Il ne manque pas en effet d'essais réalisés sur l'animal depuis les années 1980 (Wolff et coll., 1980 ; Kanapilly et Diel, 1980), années à partir desquelles on a pris conscience que la caractérisation des expositions par une concentration massique ne convenait pas vraiment à l'élaboration d'une relation dose (ou exposition)-réponse (ou effet) dans le cas des particules ultra-fines. Logiquement, on en vint à considérer les paramètres *nombre de particules* (Adamson et Bowden, 1981) et *surface* (Langer et Nolan, 1986 ; Wiessner et coll., 1988). Mais, là encore, la population générale pourrait s'interroger : existe-t-il un paramètre « fédérateur » qui permettrait une exploitation cohérente, sinon standardisée de l'ensemble des données ? Et quel serait-il ? Si nous parlons surface, puisque ce paramètre a été évoqué dans cette optique (Oberdörster, 2003 ; Donaldson et coll., 2002 ; Tran et coll., 2000a, 2000b ; Lison et coll., 1997 ; Driscoll, 1996 ; Timbrell et coll., 1988), de quelle surface parlons-nous précisément ? Est-ce la totalité de la surface géométrique, ou intervient-elle plutôt en fonction de sa capacité à engendrer des radicaux libres (Donaldson et coll., 1996 ; Dick et coll., 2003), ou en fonction de la quantité de fer ou d'autres éléments métalliques biodisponibles (et de l'état dans lequel ils se trouvent ; Fubini, 1993, 1997, 1999), ou encore en fonction d'autres substances adsorbées ?

Si on a pu mettre en évidence la réalité d'un effet de la taille de la particule, ou de sa surface, cela signifie-t-il pour autant que toutes les particules ultra-fines de tailles comparables vont présenter les mêmes dangers (Renwick et coll., 2004) ? En fait, les

effets des substances naguère globalement qualifiées de « gênantes » (*nuisance dusts, particulates not otherwise classified*) se différencient nettement quand on considère les particules ultra-fines (Cullen et coll., 2000), et certains types de particules ultra-fines semblent également doués d'une toxicité potentielle inquiétante (Lam et coll., 2004 ; Warheit et coll., 2004 ; Shvedova et coll., 2005, pour les nanotubes de carbone mono-feuillet). Les métaux ont-ils un rôle dans ces phénomènes toxiques, et lequel (Brown et al., 2000 ; Donaldson et coll., 2002 ; McNeilly et coll., 2004) ? Certains métaux (par exemple le zinc ; Adamson et coll., 2000 ; Kodavanti et coll., 2002 ; Frieditis et Adamson, 2002 ; Kodavanti et coll., 2003 ; Graff et coll., 2004) seraient-ils plus toxiques que d'autres ? Les métaux ou autres polluants présents peuvent-ils présenter des interactions, voire des synergies (Oberdörster et coll., 2000 ; Elder et coll., 2000 ; Wilson et coll., 2002 ; Pagan et coll., 2003 ; Salnikow et Lippmann, 2004 ; Arimoto et coll., 2005) ? Doit-on réellement craindre une translocation partielle des particules ultra-fines jusqu'au cerveau (Calderon-Garciduenas et coll., 2003 ; Oberdörster et coll., 2004 ; Semmler et coll., 2004), et quels en seraient les effets ? Bien d'autres questions peuvent être posées, comme le montrent les aperçus publiés par Samet (2000) ou Brunekreef (2000) à la suite d'un symposium dédié (« *What properties of particulate matter are responsible for health effects ?* »).

Enfin, dans quelle mesure pouvons-nous transposer à l'homme ce que nous découvrons par l'expérimentation animale ? Des réactions significativement différentes ont été rapportées entre différents rongeurs exposés en subchronique (particules ultra-fines de dioxyde de titane : Bermudez et coll., 2004 ; particules de pentoxyde de vanadium : Dill et coll., 2004). Comment va se situer l'homme ? Est-il possible qu'aux faibles niveaux d'exposition constatés, une partie des cancers pulmonaires chez l'homme soit attribuable à la pollution environnementale (Nafstad et coll., 2004 ; Valberg, 2004) et, si oui, selon quels mécanismes (Knaapen et coll., 2004 ; Pope et coll., 2004) ?

Si ces questions et les références citées (partielles) montrent que les difficultés sont nombreuses et n'ont pas toutes reçu de réponses satisfaisantes, elles montrent également que la question de la toxicité des particules ultra-fines est d'une grande complexité (Seagrave et Nikula, 2000 ; Warheit, 2004), ce qui renforce la nécessité de faire un point sur la question.

Des progrès métrologiques sont également souhaitables

Toutes les questions qui précèdent se rapportent aux effets toxicologiques. D'autres questions se posent, notamment en métrologie. Comme l'a écrit la Commission européenne dans sa présentation du programme « Nanosafe » (CE FP6, document non daté), « l'évaluation des risques potentiels pour la santé associés à ces matériaux nouveaux requiert la compréhension des mécanismes toxiques, l'identification d'une propriété ou d'une métrique reliant l'exposition au risque pour la santé, et une méthode de mesure de

l'exposition en lien avec cette métrique. » Il n'est en effet pas simple, en tout cas pas actuellement résolu de façon simple, de prélever et d'évaluer en temps réel (ou peu différé) des caractéristiques comme le nombre et surtout la surface des particules. Des évaluations d'exposition seraient nécessaires, « en caractérisant les concentrations en masse, nombre, et surface », et « en incluant des situations déjà connues pour exposer aux particules ultra-fines, telles que le soudage, la fonderie, l'utilisation à chaud des polymères, l'ablation par laser et les procédés utilisant la combustion » (CE FP6).

La spécialisation nécessaire, le coût et l'encombrement des appareils, la complexité de leur utilisation et de l'interprétation des données montrent qu'il reste encore beaucoup de progrès à faire (Maynard, 2001). Ces progrès sont toutefois indispensables pour mieux caractériser et comprendre les risques résultant de l'exposition à des particules ultra-fines, et optimiser les efforts de prévention.

1.3. Des enjeux très importants pour la prévention

Les budgets énormes et les espoirs presque illimités placés dans le développement et l'utilisation des particules ultra-fines dans de nombreux domaines ont déjà amené plusieurs réalisations industrielles. On peut donc dès maintenant dire, d'une part que l'exposition professionnelle est une réalité (Baron et coll., 2002 ; Zimmer et Maynard, 2002 ; Bruch, 2004 ; Kuhlbusch, 2004 ; Maynard et coll., 2004 ; Schimberg et Ukkonen, 2004 ; Spiegel-Ciobanu, 2004), d'autre part que les connaissances toxicologiques actuelles incitent pour le moins à s'interroger sur les risques encourus suite à ces expositions (Borm, 2002 ; Oberdörster, 2002, 2003 ; Oberdörster et Utell, 2002), même pour des particules de substances naguère qualifiées d'« inertes », de « gênantes » ou encore de « non prises en considération par ailleurs ». Ainsi Vicki Colvin (2003) attirait-elle l'attention sur les points suivants :

- une bonne partie des discussions portant sur les risques des PUF est extrapolée de ce que l'on sait d'autres molécules, et de tailles de particules plus importantes ;
- aux États-Unis, la plupart des fiches de données de sécurité relatives aux nanomatériaux indiquent des propriétés et des précautions d'emploi identiques à celles du matériau grossier de même composition ; les travailleurs ne disposent donc pas de directives formelles de sécurité autres. Va dans le même sens l'appréciation de la FDA concluant que le TiO_2 micronisé n'est pas un constituant nouveau. On sait pourtant – et cet ouvrage reviendra sur ce point en diverses occasions – que les PUF sont plus fortement toxiques, à dose massique égale par unité de poids corporel, que des particules plus grosses de même composition ;

- il est certes trop tôt pour procéder à une évaluation formelle du risque posé par les nanoparticules ; il se pourrait d'ailleurs que ce ne soit jamais possible, étant donné la diversité de ces matériaux. Pour autant, le cadre général de l'évaluation des dangers et des risques est très utile pour structurer la réflexion et les recherches.

Peter Hoet et ses collaborateurs (2004) ont souligné l'excès d'optimisme de certains aspects de ce document :

- étant donné les différences en taille, forme, surface, composition chimique et biopersistance, les risques potentiels pour la santé et l'environnement de chaque nanomatériau doivent être évalués au cas par cas ; même des substances chimiques « anciennes » peuvent devoir être réévaluées si leur état physique est substantiellement différent de celui qui prévalait à l'époque de leur évaluation ;
- l'importance des granulomes pulmonaires observés chez l'animal par Lam et coll. (2004) , Warheit et coll. (2004) ou encore Shvedova et coll. (2005), suite à l'exposition à des nanotubes de carbone ne doit pas être sous-estimée sous le prétexte qu'ils sont rarement observés en toxicologie expérimentale, alors que nombre d'atteintes pulmonaires sont en pratique de cette nature ;
- une faible solubilité aqueuse ne doit pas être assimilée à un faible risque en général, car elle peut impliquer longue durée de vie dans l'environnement, absorption par différents systèmes biologiques et possible accumulation ;
- enfin, il ne faut pas dire trop vite que l'exposition sera « négligeable », en particulier si le matériau se révèle hautement toxique. Il serait probablement avisé que les autorités administratives et réglementaires soutiennent des recherches pour la mise au point de batteries de tests rapides, peu coûteux et scientifiquement fiables, pour déterminer la toxicité et la biopersistance des nanomatériaux.

Il faut encore avoir présent à l'esprit que les risques de pénétration cutanée par des particules ultra-fines, ou d'effets locaux, ne semblent pas devoir être exclus *a priori* (Shvedova et coll., 2003 ; Tinkle et coll., 2003 ; Tinkle, 2004).

Des politiques de prévention doivent être élaborées au plus vite, pré-adaptées aux conditions des expositions au travail (caractérisées notamment par des concentrations plus élevées et plus rapidement variables que dans l'environnement, des substances polluantes différentes, une pénétration percutanée éventuelle, une population exposée n'incluant pas d'enfants ou de personnes âgées ou en trop mauvaise condition physique) et enfin optimisées en fonction de l'expérience acquise (Maynard et coll., 2003). Différents auteurs ont évoqué des risques d'erreurs d'appréciation aux conséquences potentiellement inadmissibles, comme pour l'amiant (Mossman, 2000 ; ETC, 2003a), les silices cristallines (Lam, 2004), ou encore en raison de recours à un spécieux principe « d'équivalence substantielle » (Millstone et coll., 1999). Un « Groupe de travail pour de meilleures réglementations » (BRTF, 2003), indépendant, créé pour conseiller le gouvernement du Royaume-Uni en vue d'une réglementation et de sa mise en œuvre à

la fois transparente, responsable, proportionnée, cohérente, et ciblée, constitué de participants non rémunérés provenant d'horizons divers, a émis pour la nanotechnologie les recommandations suivantes :

« Le gouvernement devrait :

- permettre au public d'examiner les risques par lui-même, au cours d'un débat informé, et l'aider à prendre ses propres décisions en lui fournissant les informations pertinentes ;
- être ouvert dans son processus de décision, et reconnaître là où il y a des incertitudes ;
- communiquer avec le public au cours du processus de décision, et l'y impliquer autant qu'il est possible ;
- s'assurer que la communication passe bien dans les deux sens ;
- prendre fermement en main toute question sur les risques, notamment en ce qui se rapporte à la fourniture d'information et à la politique de mise en œuvre. »

De telles recommandations, exigeantes, sont conçues pour le grand public. Elles sont à considérer comme « idéales », en ce sens qu'elles sont probablement inapplicables dans toute leur portée, ce qui ne signifie pas qu'il n'est pas souhaitable d'y tendre. Si les préoccupations de prévention ne doivent pas rendre les études scientifiques ou l'activité professionnelle difficiles au point de les ralentir abusivement, voire d'y faire obstruction, il ne faut pas non plus qu'elles deviennent une gêne que l'on contourne au risque de devoir en payer les conséquences à un niveau socialement, financièrement, ou éthiquement insupportable. Comme l'écrit la Commission européenne (CE FP6) : « C'est une absolue nécessité que les producteurs de ces matériaux nouveaux s'assurent que la sécurité de leurs produits pour les travailleurs et pour la population générale est correctement évaluée. L'histoire a souvent montré que cela n'a pas été le cas. » L'étendue actuelle et envisagée des domaines d'application des particules ultra-fines et nanoparticules est telle qu'elle pose un formidable défi aux capacités d'adaptation de nos systèmes de prévention. Saurons-nous le relever et montrer que risque nouveau ne rime ni avec fatalité, ni avec immobilisme ?

2. Pourquoi un tel intérêt pour les particules ultra-fines ?

Une grande partie de l'intérêt pour les particules ultra-fines vient en fait de celui porté aux nanoparticules : lorsque la taille de la particule décroît, on parvient à une frontière caractérisée par l'apparition de propriétés ou de comportements nouveaux. Ainsi, des matériaux isolants, opaques, diamagnétiques, inertes, etc. peuvent devenir respectivement conducteurs, transparents, magnétiques, réactifs, etc. (ou vice versa), ou encore

changer de couleur, devenir solubles, former spontanément des structures ordonnées, etc. Cette brutale évolution des propriétés, parfois qualifiée de « saut quantique », se produit lorsqu'on atteint des dimensions inférieures à environ 50 nm. Par ailleurs, plus la taille diminue, plus le rapport surface/volume devient grand, et plus les propriétés de surface finissent par devenir plus importantes que la masse en jeu.

Consultés par une grosse société de réassurance, Hett et coll. (2004) ont dialogué avec différentes parties prenantes pour évaluer en toute transparence les risques et les opportunités de ces nouvelles technologies, et mieux définir les conditions dans lesquelles ces risques peuvent être couverts. Les auteurs ne retiennent que les particules, revêtements ou matériaux de taille inférieure à 100 nm présentant des propriétés spécifiques en lien avec leur taille, ce qui leur permet de ne pas considérer les structures de plus grande taille relevant, selon eux, de microtechniques déjà connues et non douées de propriétés nouvelles mais rebaptisées pour attirer l'attention et les subsides.

Selon ces auteurs, la nanotechnologie en général répond au souhait déjà ancien de l'industrie de tout miniaturiser, en permettant de fabriquer de manière contrôlée des particules et des structures de quelques millièmes de millimètre, qui serviront à réaliser des puces pour ordinateurs plus rapides, des batteries plus efficaces, des vecteurs pour médicaments, des revêtements ultra-fins à usages multiples, ou encore des polymères aux performances jusqu'ici hors d'atteinte. Non seulement les propriétés anciennes sont conservées mais, bien souvent, largement améliorées, ou complétées par des propriétés qui semblaient jusque récemment incompatibles avec elles. À titre d'exemple est reproduit ci-après (tableau 1) un tableau relatif aux applications médicales ou pharmaceutiques.

Mieux encore, d'autres paramètres peuvent être introduits, en jouant non seulement sur la nature et la forme de la PUF (métallique ou polymétallique, polymère ou copolymère, nanoliposomes, sphères creuses ou non, tubes, rubans...), mais encore sur ses propriétés de surface grâce à des traitements physiques ou chimiques qui peuvent eux-mêmes être modulés à l'infini. On peut encore construire, atome par atome, des espèces n'existant pas dans la nature ou qui ne peuvent actuellement être synthétisées par les méthodes classiques. La portée des applications potentielles devient immense, défiant l'imagination et multipliant les pistes de recherche ou de mise en œuvre (voir par exemple Holister, 2002 ; ETC, 2003b ; Dürrenberger et coll., 2004 ; CE, 2004b ; CNRS, 2005 ; AFSSET, 2006). Certains parlent de nouvelle révolution industrielle, comparable à l'apparition de l'électricité ; ils vont même jusqu'à imaginer des « nanorobots » capables d'actions autonomes, voire d'autoréplication, qui rendraient rapidement la vie impossible à l'homme. De telles perspectives relèvent de la fiction mais montrent les dangers que certaines orientations de recherches pourraient receler.

Pourtant, les propriétés particulières à certaines PUF étaient mises à profit depuis de nombreuses années sans qu'on ait perçu une possible généralisation ; ainsi pour la

Matériaux/techniques	Propriétés	Applications
Nanoparticules liées à des molécules d'intérêt (marqueurs) (Holister, 2002)	Des molécules individuelles peuvent être détectées	Détection précoce de cellules cancéreuses, par exemple
« Laboratoires sur puce » (Saxl, 2000)	Miniaturisation et accélération du processus analytique	Création de laboratoires portables, prévention et contrôle de maladies, pollution environnementale
Nanocristaux fluorescents	Suivi extrêmement sensible de molécules marquées	Diagnostics médicaux
Nanoparticules 50-100 nm (Miles et Jarvis, 2001)	Pénètrent facilement une tumeur (de plus grosses ne pénètrent pas)	Traitement de cancers
Nanoparticules 100-200 nm (Miles et Jarvis, 2001)	Faible solubilité	Améliorer les remèdes existants
Polymères (Holister, 2002)	Peuvent être fabriqués avec une grande précision	Dispositifs porteurs de médicaments nanobiologiques
Ligands sur PUF (Holister, 2002)	Peuvent être fabriqués avec une grande précision	Le ligand se fixe à des récepteurs tissulaires et relargue un médicament
Nanocapsules (Holister, 2002)	Échappent au système immunitaire et relarguent un médicament au site choisi	Un traitement du sida utilisant des fullérènes va être essayé en clinique (Ho, 2002)
Adhésion renforcée sur PUF (Holister, 2002)	Amélioration de la durée de vie du médicament	Traitements à effets retardés
Matériaux nanoporeux (Holister, 2002)	Échappent au système immunitaire et relarguent un médicament au site choisi	En lien avec des détecteurs, des implants actifs pourraient être imaginés
« Pharmacie sur puce » (Saxl, 2000)	Suivi et régulation de l'équilibre hormonal	Par exemple traitement du diabète
Tri biomoléculaire (Holister, 2002)	Des membranes ou nanopores peuvent différencier des molécules chirales	Analyse et séquençage de gènes
Nanoprothèses (Miles et Jarvis, 2001)	Encombrement et poids réduits, résistance et compatibilité tissulaire améliorées	Implants rétiniens, crâniens
Manipulation cellulaire (Miles et Jarvis, 2001)		Régénération nerveuse

Tableau 1. Exemples d'applications médicales ou pharmaceutiques futures, d'après Hett et coll. (2004). Deux tableaux similaires figurent dans les annexes de ce livret, l'un relatif aux technologies de l'information, l'autre à la production d'énergie.

fabrication des pneumatiques, dont la résistance est ce qu'elle est grâce à l'adjonction de PUF de noirs de carbone. Mais la technique était en grande partie empirique, et on ne cherchait pas comme maintenant à fabriquer des particules aux caractéristiques dimensionnelles ou chimiques strictement définies. Ce dernier progrès n'a été rendu possible que grâce à des avancées telles que le microscope à effet tunnel ou le microscope à forces atomiques, qui permettent de visualiser ou de réaliser des manipulations à l'échelle de la molécule ou même de l'atome.

Les immenses perspectives ouvertes, encore amplifiées par la presse, suscitent le plus souvent l'enthousiasme et le panurgisme, mais aussi une incompréhension alimentée par la rapidité des évolutions et la difficulté à les connaître et à les comprendre. Elles entraînent aussi parfois des réactions d'opposition à un progrès qui semble échapper à tout contrôle, laissant apparaître la possibilité d'un rejet global, comme ce fut le cas pour les organismes génétiquement modifiés. C'est pour tenter d'éviter de tels risques que divers programmes ou organisations prévoient des volets d'étude des réactions sociétales et des actions de communication. Bien que les budgets correspondants ne représentent qu'une faible part du total dédié aux nanotechnologies, le nombre des colloques, symposiums, débats, journées d'étude ou de formation, de communications en tout genre... est déjà tel qu'il est quasi impossible d'en avoir une vue d'ensemble, et mène à s'interroger sur les conditions de coordination et de répercussion de ces initiatives. Quoi qu'il en soit, elles participent à nourrir un « effet de mode », lequel participe à faire grandir encore l'intérêt porté au nanomonde en général, et aux particules ultra-fines en particulier.

3. Portée, limites et organisation de l'ouvrage

Les principaux buts de ce travail sont de présenter l'état des connaissances relatives au comportement physique général et aux effets potentiels des PUF sur la santé, en particulier dans le contexte de l'exposition professionnelle, de présenter quelques cas concrets représentatifs de telles situations (anciens ou en émergence), de proposer des lignes générales d'interprétation des propriétés toxiques (paramètres physiques et/ou chimiques notamment), ainsi que d'initier une réflexion relative aux mesures de prévention à envisager dans ce contexte précis.

3.1. Définition des particules ultra-fines (PUF)

Comme le rappelle un rapport australien explicitement consacré aux PUF (Morawska et coll., 2004), il est clair que les distinctions entre les particules ultra-fines et les autres, comme celles entre d'autres tranches granulométriques, restent plus ou moins

arbitraires : la nature ne crée pas de telles séparations mais donne naissance à des ensembles polydispersés sans frontière nette entre différentes tailles.

La définition des nanoparticules actuellement partout retrouvée dit qu'elles sont de taille inférieure à 0,1 μm (100 nm). Un groupe de travail (CE, 2004a) a proposé des distinctions fondées sur les utilisations (applications médicales, technologies de l'information, production et stockage de l'énergie, science des matériaux, manufacture, instrumentation, alimentation, eau et environnement, sécurité, etc.), mais n'apporte rien sur le plan des caractéristiques physicochimiques.

Actuellement, il n'est pas de consensus et chacun parle de « particules ultra-fines » (PUF) ou de « nanoparticules » (NP) de manière plus ou moins équivalente, ou parfois avec des nuances, comme c'est encore le cas dans cet ouvrage, selon les contributions. Des groupes de travail internationaux proposent maintenant des définitions (voir le chapitre 1, point 1), dont l'adoption rapide et entière devrait limiter de possibles hésitations.

3.2. Sélection et analyse des références

Rappelons que cette expertise est centrée sur le monde professionnel. Par conséquent, toutes les références relatives aux nanotechnologies, aux applications médicales, à l'environnement, etc., ne sont prises en considération que dans la mesure où elles apportent des éléments utiles à la compréhension ou à la connaissance souhaitables pour l'évaluation des dangers ou des risques en milieu professionnel.

Sauf précisions contraires, les PUF considérées sont des PUF minérales solides ; les PUF organiques ou liquides n'ont, en principe, pas été prises en considération. La première voie d'exposition à laquelle on pense, parlant de particules ultra-fines solides, est la voie inhalatoire. Cependant, comme nous l'avons écrit plus haut, la possibilité de pénétration percutanée par des PUF, ou d'effets cutanés locaux, ne semble pas devoir être exclue *a priori* ; la recherche de références a donc également été faite dans cette direction. D'autre part, une fois dans l'organisme, les PUF peuvent s'y disséminer et exercer des effets systémiques, voulus ou non (Liu et Meng, 2005).

Concrètement, il a été demandé à chaque expert de sélectionner les textes qui traitent explicitement des PUF, en elles-mêmes ou en comparaison avec des aérosols solides fins ou grossiers ; pour ce qui est des propriétés que l'on a des raisons de penser communes à plusieurs fractions granulométriques dont les PUF (par exemple rôle du fer ou d'autres métaux, présence ou formation de radicaux libres, espèces chimiques adsorbées...), il a été souhaité que soit présenté un résumé de l'essentiel de l'état de la question avant de détailler ce qui se rapporte clairement aux PUF. Ce résumé pourra être basé sur des articles de synthèse, éventuellement actualisés sur certains points à l'aide de références plus récentes.

Les recherches ont été menées de manière usuelle, c'est-à-dire à la fois à l'aide de moteurs de recherche généraux (type Google) ou spécialisés (par exemple PubMed, Toxnet), en explorant des sites Internet d'institutions ou d'éditeurs scientifiques reconnus (par exemple OMS, Health Effects Institute, US EPA ; éditeurs ou groupements d'éditeurs comme Ingenta, Taylor et Francis, Science Direct, etc.), en examinant les références bibliographiques de divers types de publications (scientifiques, rapports, conférences, sites Internet de ministères français ou étrangers ; sites et documents spécialisés, par exemple sur les émissions diesels, les nanotubes de carbone, etc.), enfin en consultant des sites de fabricants de PUF, ou d'organisations de promotion des PUF, ou de lutte contre leurs dangers possibles. Les articles de type journalistique n'ont généralement pas été utilisés, mais ont été examinées les publications dont ils faisaient explicitement état.

N'ont pas été systématiquement incluses ou examinées les publications relatives aux effets des particules environnementales, d'ailleurs extrêmement nombreuses, sinon dans la mesure où elles pouvaient aider à la connaissance ou à la compréhension de la toxicité des PUF. Autrement dit, un examen attentif a été consacré aux quelques publications traitant explicitement des $PM_{0,1}$ (qui correspondent *stricto sensu* à des PUF), aux principales références ou rapports traitant des $PM_{2,5}$ (souvent dites « fines », qui incluent les PUF ; notamment publications ou rapports de synthèse), et quelques références seulement relatives aux PM_{10} (souvent qualifiées de « grossières » dans le domaine environnemental), dans la mesure où elles abordaient des aspects susceptibles de nous intéresser (par exemple en comparant l'intérêt des paramètres masse, nombre ou surface, en traitant de mécanismes d'action, ou encore en incluant un examen critique d'autres publications).

Enfin, soulignons que les divers participants de cette expertise ont été invités à s'exprimer à titre personnel : ils ne représentaient pas pour ce travail leur employeur ou un groupe constitué. La recherche d'un consensus, sans être éliminée, n'était pas un but. Au contraire, il semble important que les différentes interprétations puissent avoir droit de cité, d'une part pour permettre de mieux réaliser la complexité de l'interprétation des données et ses conséquences potentielles (par exemple, les mesures de prévention peuvent dépendre largement de l'interprétation retenue), d'autre part pour faciliter au lecteur un abord selon ses critères personnels de la question, libre à lui de compléter son information avec des publications plus récentes ou écrites dans d'autres perspectives.

La recherche systématique des publications a été arrêtée pour cet ouvrage fin août 2006.

3.3. Plan de l'ouvrage

Il est naturel de commencer par situer l'objet de l'étude, donc en présentant des généralités sur les PUF (ce qu'elles sont, comment on les caractérise, comment elles se

comportent – chapitres 1 à 3). Comme on sait relativement peu de choses sur cette question dans l’environnement professionnel, où l’on s’est plus intéressé jusqu’à présent à les produire et à les utiliser qu’à en évaluer les dangers, et que cette question a semblé naître de travaux environnementaux (voir plus haut), nous présentons d’abord un aperçu d’ensemble des acquis dans ce domaine (chapitre 4). Puis, pour prendre en compte les besoins ou souhaits concrets des lecteurs, nous présentons les connaissances relatives à des PUF pour lesquelles existent déjà (dioxyde de titane, oxyde de zinc, noirs de carbone, particules diesels, fumées de soudage) ou vont apparaître à court terme des expositions professionnelles (nanotubes de carbone, fullérènes... ; chapitres 5 et 6). Au-delà de ces cas spécifiques, il paraît nécessaire de chercher à repérer les principaux déterminants, chimiques et/ou physiques, de la toxicité, ce qui permettrait, dans la mesure où c’est possible et raisonnable, de prévoir en partie les dangers de PUF non encore utilisées ou fabriquées industriellement. Une discussion, répartie sur plusieurs chapitres (chapitres 7 à 9), situera les enjeux et les limites de l’exercice, proposera des mesures ou orientations de prévention et des directions de recherche, et les conclusions donneront une synthèse et des perspectives.

Nous espérons ainsi offrir à nos lecteurs une information non pas complète, car cela semble déjà impossible à ce niveau, mais une vision d’ensemble et une certaine « philosophie » susceptible de l’aider à déterminer ses comportements et décisions dans un monde encore mal connu et en très rapide évolution, et pour lequel il n’existe guère, à notre connaissance, d’ouvrage un peu général en langue française.

3.4. Conseils et avertissements finaux

Comment lire ce document ?

Les chapitres présentent les publications retenues, avec les opinions et conclusions de leurs auteurs ; les parties discussion présentent au contraire l’opinion raisonnée de ceux qui rapportent ces publications. Elles peuvent réévaluer ce qu’ont écrit les auteurs originaux, soit en raison d’une interprétation différente des mêmes données, soit parce que des éléments nouveaux permettent d’enrichir ou de modifier les interprétations originales.

À propos des rédactions

La complexité et l’intrication des facteurs de toxicité des PUF, la diversité des domaines abordés par les publications et des façons possibles de les interpréter, les inévitables recoupements qu’entraîne le passage du particulier au général ou l’inverse, font que des publications importantes sont citées par des auteurs différents avec des abords différents. Le lecteur attentif trouvera donc des redites, mais il ne s’agit pas en général de

répétitions. Il a d'autre part paru bon de lui épargner des allers et retours dans l'ouvrage pour se remettre en mémoire ce qu'il a déjà oublié, ou peut-être pas encore lu. Il est aussi nécessaire de laisser à chaque auteur, voire à chaque passage son style propre, parfois limité à l'essentiel, parfois nuancé, cela en fonction du but recherché (discussion, pédagogie, conclusion, résumé...).

À propos des références à l'Internet

Par le réseau Internet, il est possible de trouver énormément d'informations. Elles sont malheureusement de qualité extrêmement variable. Certains documents sont tout à fait valables, notamment des publications scientifiques, des rapports officiels ou écrits collectivement par des experts ; d'autres ne peuvent être cités avec une confiance totale, soit parce que non vérifiés ou non vérifiables, soit parce qu'issus d'organisations qui ont des intérêts autres que scientifiques dans le domaine présenté, même si parfois la qualité du document paraît excellente. Nous avons le plus souvent choisi de renoncer à citer des références Internet ne correspondant pas à des publications dites *peer reviewed* ; quelques sites sont cependant indiqués à la fin de certains chapitres, pour aider le lecteur qui le souhaiterait à compléter son information. Certaines adresses peuvent n'être plus valables ; dans tous les cas, il revient au lecteur d'apprécier par lui-même le degré de confiance à apporter à ces compléments.

Bibliographie

- Adamson IY, Bowden DH (1981). Dose response of the pulmonary macrophagic system to various particulates and its relationship to transepithelial passage of free particles. *Exp Lung Res* **2**(3) 165-75.
- Adamson IY, Prieditis H, Hedgecock C, Vincent R (2000). Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. *Toxicol Appl Pharmacol* **166**(2) 111-119.
- AFSSE (2003). Association française de sécurité sanitaire environnementale. Note sur l'impact sanitaire des particules diesel (document de travail). Saisine N° 2003/012, 13 octobre 2003.
- AFSSET (2006). Les nanomatériaux. Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. Rapport de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, juillet 2006, pp. 45-51.
- Altmann J (2004). Military nanotechnology: perspectives and concerns. Foresighting the new technology wave-Expert group. State of the art reviews and related papers, 14th June 2004, 5-26. http://europa.eu.int/comm/research/conferences/2004/ntw/pdf/soa_en.pdf
- APHEIS (2004). Évaluation de l'impact sanitaire de la pollution atmosphérique dans 26 villes européennes. http://www.invs.sante.fr/publications/2004/apheis/APHEIS_p001-060.pdf
- Arimoto T, Kadiiska MB, Sato K, Corbett J, Mason RP (2005). Synergistic production of lung free radicals by diesel exhaust particles and endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* **171**(4) 379-387.

- Atkinson RW, Bremner SA, Anderson HR, Strachan DP, Bland JM, de Leon AP (1999). Short-term associations between emergency hospital admissions for respiratory and cardiovascular disease and outdoor air pollution in London. *Arch Env Health* **54**(6), 398-411.
- Baron-PA, Maynard-AD, Foley-M (2002). Evaluation of aerosol release during the handling of unrefined single walled carbon nanotube material. NIOSH, 2002 Dec: 1-22.
- Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* **77**(2) 347-357.
- Bhatia R, Lopipero P, Smith AH (1998). Diesel exhaust exposure and lung cancer. *Epidemiology* **9**(1) 84-91. Comments in: *Epidemiology* 1998 Jan; 9(1) 4-6. *Epidemiology* 1998 Jul; 9(4) 474.
- Borm PJ (2002). Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. *Inhal Toxicol* **14**(3) 311-324.
- Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K (2000). Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med* **57**(10) 685-691.
- BRTF (Better Regulation Task Force) (2003). Scientific Research: Innovations with Controls. January 2003, 44 pages. <http://www.brtf.gov.uk/taskforce/reports/Scientificresearch.pdf>.
- Bruch J (2004). Occupational safety and environmental protection in the industrial laser beam ablation process, in BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces", BIA-Report 7/2003e, pp. 139-146.
- Brunekreef B (2000). What Properties of Particulate Matter are Responsible for Health Effects? *Inhal Toxicol* **12** (Suppl. 1) 15-18.
- Bunn WB 3rd, Valberg PA, Slavin TJ, Lapin C (2002). What is new in diesel? *Int Arch Occup Environ Health* **75** (Suppl.) S122-S132.
- Burnett RT, Dales R, Krewski D, Vincent R, Dann T, Brook JR (1995). Associations between ambient particulate sulfate and admissions to Ontario hospitals for cardiac and respiratory diseases. *Am J Epidemiol* **142**(1) 15-22.
- Calderon-Garciduenas L, Maronpot RR, Torres-Jardon R, Henriquez-Roldan C, Schoonhoven R, Acuna-Ayala H, Villarreal-Calderon A, Nakamura J, Fernando R, Reed W, Azzarelli B, Swenberg JA (2003). DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicol Pathol* **31**(5) 524-538.
- CE (1999). Directive 1999/30/CE du Conseil, du 22 avril 1999, relative à la fixation de valeurs limites pour l'anhydride sulfureux, le dioxyde d'azote et les oxydes d'azote, les particules et le plomb dans l'air ambiant. *Journal officiel* n° L 163 du 29/06/1999 pp. 0041-0060.
- CE (2004a). Nanotechnologies: a preliminary risk analysis on the basis of a workshop organized in Brussels on 1-2 March 2004 by the Health and Consumer Protection Directorate General of the European Commission, 143 pages.
- CE (2004b). Communication from the Commission. Towards a European strategy for nanotechnology. COM(2004) 338 final, Brussels, 12.5.2004, 25 pages.
- CE FP6: Expression of Interest for Integrated Project Priority Thematic Area: Nanotechnology Risk Assessment of Airborne Nanoparticles in the Workplace (NANOSAFE). www.tau.ac.il/research/EU/europe/nano/EOIvers2.pdf

- Chopin T (2004). Nanoparticules minérales et leurs applications industrielles. Rapport *Nanosciences, nanotechnologies* de l'Académie des sciences et de l'Académie des technologies. Ed. Tech & Doc, pp. 384-390.
- CNRS (2005). Focus - Les nanosciences. Brochure de 42 pages (septembre 2005).
- Colvin VL (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol* **21**(10) 1166-1170.
- Cullen RT, Tran CL, Buchanan D, Davis JM, Searl A, Jones AD, Donaldson K (2000). Inhalation of poorly soluble particles. I. Differences in inflammatory response and clearance during exposure. *Inhal Toxicol* **12**(12) 1089-1111.
- Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* **15**(1) 39-52.
- Dill JA, Lee KM, Mellinger KH, Bates DJ, Burka LT, Roycroft JH (2004). Lung deposition and clearance of inhaled vanadium pentoxide in chronically exposed F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicol Sci* **77**(1) 6-18.
- Dockery DW, Pope CA 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG Jr, Speizer FE (1993). An association between air pollution and mortality in six US cities. *N Engl J Med* **329**(24) 1753-9. Comments in: *N Engl J Med*. 1993 Dec 9; 329(24) 1807-8. *N Engl J Med*. 1994 Apr 28; 330(17) 1237-8. *N Engl J Med*. 2004 Jan 8; 350(2) 198-199.
- Donaldson K, Beswick PH, Gilmour PS (1996). Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol Lett* **88**(1-3) 293-298.
- Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V (2002). The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* **15**(2) 213-220.
- Donaldson K, Li XY, MacNee W (1998). Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci* **29**(5-6) 553-560.
- Driscoll KE (1996). Role of Inflammation in the Development of Rat Lung Tumors in Response to Chronic Particle Exposure. *Inhal Toxicol* **8** (Suppl.) 139-153.
- Dürrenberger F, Höck J, Höhener K (2004). Overview of completed and ongoing activities in the field: Safety and Risks of Nanotechnology. TEMAS AG, Technologie Management, version 2.1 (10/06/2004) 60 pages.
- Elder AC, Gelein R, Azadniv M, Frampton M, Finkelstein J, Oberdörster G (2004a). Systemic effects of inhaled ultrafine particles in two compromised, aged rat strains. *Inhal Toxicol* **16** (6-7) 461-471.
- Elder AC, Gelein R, Finkelstein JN, Cox C, Oberdörster G (2000). Pulmonary inflammatory response to inhaled ultrafine particles is modified by age, ozone exposure, and bacterial toxin. *Inhal Toxicol* **12** (Suppl. 4) 227-246.
- Elder A, Gelein R, Finkelstein J, Phipps R, Frampton M, Utell M, Kittelson DB, Watts WF, Hopke P, Jeong CH, Kim E, Liu W, Zhao W, Zhuo L, Vincent R, Kumarathan P, Oberdörster G (2004b). On-road exposure to highway aerosols. 2. Exposures of aged, compromised rats. *Inhal Toxicol* **16** (Suppl. 1), 41-53.
- Englert N (2004). Fine particles and human health--a review of epidemiological studies. *Toxicol Lett* **149**(1-3) 235-242.
- EPA (1998) -SAB-CASAC (Science Advisory Board - Clean Air Scientific Advisory Committee). Review of the Diesel health assessment document. EPA-SAB-CASAC-99-001, October 7, 1998.

- EPA - IRIS (2003). Health effects assessment for Diesel engine exhaust. <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=29060>
- ETC (Erosion, Technology and Concentration) Group (2003a). Size Matters! No Small Matter II: The Case for a Global Moratorium. Occasional Paper Series, Volume 7, No. 1, April 2003.
- ETC (Erosion, Technology and Concentration) Group (2003b). From genomes to atoms. The Big Down. Atomtech: technologies converging at the nano-scale. January 2003, 84 pages.
- Ferin J, Oberdörster G, Penney DP, Soderholm SC, Gelein R, Piper HC (1990). Increased Pulmonary Toxicity of Ultrafine Particles? I. Particle Clearance, Translocation, Morphology. *J Aerosol Sci* **21**(3) 381-384.
- Ferin J, Oberdörster G, Soderholm SC, Gelein R (1991). Pulmonary tissue access of ultrafine particles. *J Aerosol Med* **4**(1) 57-68.
- Le Figaro du vendredi 7 mai 2004, page 19. Des articles notamment de C. Petitnicolas et M. Frat.
- Fubini B (1993). The Possible Role of Surface Chemistry in the Toxicity of Inhaled Fibers. *Fiber Toxicology*, D. B. Warheit, Editor; Academic Press, Inc., San Diego, pages 229-257.
- Fubini B (1997). Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ Health Perspect* **105** (Suppl. 5), 1013-1020.
- Fubini B, Areán CO (1999). Chemical aspects of the toxicity of inhaled mineral dusts. *Chem Soc Rev* **28** (6) 373-381.
- Gamble JF (1998). PM_{2.5} and mortality in long-term prospective cohort studies: cause-effect or statistical associations? *Environ Health Perspect* **106**(9) 535-49. Comments in: *Environ Health Perspect* 1999 Aug; 107(8) A392-394. *Environ Health Perspect* 1999 May; 107(5) A234-236. *Environ Health Perspect* 2000 Feb; 108(2) 91-92.
- Gardner SY, McGee JK, Kodavanti UP, Ledbetter A, Everitt JI, Winsett DW, Doerfler DL, Costa DL (2004). Emission-particle-induced ventilatory abnormalities in a rat model of pulmonary hypertension. *Environ Health Perspect* **112**(8) 872-878.
- Gouzènes L (2004). Rapport *Nanosciences, nanotechnologies* de l'Académie des sciences et de l'Académie des technologies. Ed. Tech & Doc, pp. 465-472.
- Graff DW, Cascio WE, Brackhan JA, Devlin RB (2004). Metal particulate matter components affect gene expression and beat frequency of neonatal rat ventricular myocytes. *Environ Health Perspect* **112**(7) 792-798.
- de Hartog JJ, Hoek G, Peters A, Timonen KL, Ibaldo-Mulli A, Brunekreef B, Heinrich J, Tiittanen P, van Wijnen JH, Kreyling W, Kulmala M, Pekkanen J (2003). Effects of fine and ultrafine particles on cardiorespiratory symptoms in elderly subjects with coronary heart disease: the ULTRA study. *Am J Epidemiol* **157**(7) 613-623.
- Hett A (et collaborateurs non précisés) (2004). Nanotechnology – Small matter, many unknowns. Swiss Reinsurance Company (Swiss Re) P.O. Box 8022, Zurich. 53 pages.
- Ho MW (2002). Nanotechnology, a hard pill to swallow. <http://www.i-sis.org.uk/nanotechnology.php>
- Hoet PM, Nemmar A, Nemery B (2004). Health impact of Nanomaterials. Letter to the Editor. *Nature Biotechnol* **22**(1) 19. <http://lists.collectifs.net/pipermail/intercage/2004-January/001002.html>.
- Holister P (2002). Nanotech: The Tiny Revolution. *CMP Cientifica*; July 2002. http://www.cientifica.info/html/docs/NOR_White_Paper.pdf

- Ibald-Mulli A, Wichmann HE, Kreyling W, Peters A (2002). Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J Aerosol Med* **15**(2) 189-201.
- Brügger L. (2001) – Les technologies naissantes et leur impact sur le contrôle des armements. Rapport à l'OTAN, octobre 2001. <http://www.nato-pa.int/archivedpub/comrep/2001/au-223-f.asp>
- Jones K, Lieberman B (2004). A Clear Mistake (14/01/2004). <http://www.techcentralstation.com/092603D.html>.
- Kanapilly GM, Diel JH (1980). Ultrafine plutonium-239-labeled plutonium dioxide aerosol generation, characterization and short-term inhalation study in the rat. *Health Phys* **39**(3) 505-520.
- Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer* **109**(6) 799-809.
- Kodavanti UP, Moyer CF, Ledbetter AD, Schladweiler MC, Costa DL, Hauser R, Christiani DC, Nyska A (2003). Inhaled environmental combustion particles cause myocardial injury in the Wistar Kyoto rat. *Toxicol Sci* **71**(2) 237-245. Comment in: *Toxicol Sci* 2003 Jul; 74(1) 228; author reply 228-229.
- Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Hauser R, Christiani DC, Samet JM, McGee J, Richards JH, Costa DL (2002). Pulmonary and systemic effects of zinc-containing emission particles in three rat strains: multiple exposure scenarios. *Toxicol Sci* **70**(1) 73-85.
- Kuhlbusch T (2004). Ultrafine particles at industrial workplaces, in BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces", BIA-Report 7/2003e, pp. 147-156.
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL X (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci* **77**(1) 126-134.
- Langer AM, Nolan RP (1986). Physicochemical Properties of Quartz Controlling Biological Activity. Silica, Silicosis, and Cancer: Controversy in Occupational Medicine, D. F. Goldsmith, D. M. Winn, C. M. Shy, Editors; New York, Praeger Publishers, Cancer Research Monographs, Vol. 2, pages 125-135.
- Last JA, Ward R, Temple L, Pinkerton KE, Kenyon NJ (2004). Ovalbumin-induced airway inflammation and fibrosis in mice also exposed to ultrafine particles. *Inhal Toxicol* **16**(2) 93-102.
- Lieberman B (2003). Are Small Particles Such a Big Problem? (26/09/2003). <http://www.techcentralstation.com/092603D.html>.
- Lison D, Lardot C, Huaux F, Zanetti G, Fubini B (1997). Influence of particle surface area on the toxicity of insoluble manganese dioxide dusts. *Arch Toxicol* **71**(12) 725-729.
- Liu X, Meng Z (2005). Effects of airborne fine particulate matter on antioxidant capacity and lipid peroxidation in multiple organs of rats. *Inhal Toxicol* **17**(9) 467-473.
- Mauderly JL (2001). Diesel emissions: is more health research still needed? *Toxicol Sci* **62**(1) 6-9.
- Maynard A (2001). Airborne Particulate Matter Research Projects. <http://www.pmr.org/pmr/PM.nsf/WebProj/0985EE9CE889228E85256A06006A1223>.
- Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V (2004). Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health A* **67**(1) 87-107.

- Maynard R, Krewski D, Burnett RT, Samet J, Brook JR, Granville G, Craig L (2003). Health and air quality: directions for policy-relevant research. *J Toxicol Environ Health A* **66(16-19)** 1891-1904.
- McNeilly JD, Heal MR, Beverland IJ, Howe A, Gibson MD, Hibbs LR, MacNee W, Donaldson K (2004). Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* **196(1)** 95-107.
- Miles I, Jarvis D (2001). *Nanotechnology – A Scenario for Success in 2006*. Teddington, UK: HMSO. National Physical Laboratory Report Number: CBTL16. http://libsvr.npl.co.uk/npl_web/pdf/cbtlm16.pdf
- Millstone E, Brunner E, Mayer S (1999). Beyond 'Substantial Equivalence'. *Nature* **401 (6753)** 525-526.
- Morawska L, Moore MR, Ristovski Z (2004). Health Impacts of Ultrafine Particles. Desktop literature review and analysis. Australian Government, Department of the Environment and Heritage, ISBN 0642550557, 291 pages.
- Mossman BT (2000). Mechanisms of action of poorly soluble particulates in overload-related lung pathology. *Inhal Toxicol* **12(1-2)** 141-148.
- Nafstad P, Haheim LL, Wisloff T, Gram F, Oftedal B, Holme I, Hjermann I, Leren P (2004). Urban air pollution and mortality in a cohort of Norwegian men. *Environ Health Perspect* **112(5)** 610-615.
- Oberdörster G (2002). Airborne ultrafine particles at the workplace and in the environment: cause for concern? <http://www.asip.org/mtgs/EB03/gunterab.htm>.
- Oberdörster G (2003). Effects and fate of inhaled ultrafine particles. Nanotechnology and the Environment, Sunday, March 23, 2003 Convention Center -- Room 392, Oral. <http://oasys2.confex.com/acs/225nm/techprogram/P598970.HTM>.
- Oberdörster G, Ferin J, Finkelstein G, Wade P, Corson N (1990). Increased Pulmonary Toxicity of Ultrafine Particles? II. Lung Lavage Studies. *J Aerosol Sci* **21(3)** 384-387.
- Oberdörster G, Yu CP (1990). The Carcinogenic Potential of Inhaled Diesel Exhaust: A Particle Effect? *J Aerosol Sci* **21 (Suppl. 1)** 397-401.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm S, Cox C, Baggs R, Finkelstein J (1991). Inhaled ultrafine particles: evidence of their increased pulmonary toxicity. International conference of the American Lung Association and the American Thoracic Society, Anaheim, California, USA, May 12-15, 1991. *Am Rev Respir Dis* **143 (4 PART 2)**.
- Oberdörster G, Gelein RM, Ferin J, Weiss (1995). Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles? *Inhal Toxicol* **7(1)** 111-124.
- Oberdörster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, Elder AC (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* 96, pp. 5-74; disc. pp. 75-86.
- Oberdörster G, Utell M (2002). Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract-and beyond? *Environ Health Perspect* (editorial) **110(8)** A440-A441.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004). Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhal Toxicol* **16(6-7)** 437-445.
- Pagan I, Costa DL, McGee JK, Richards JH, Dye JA (2003). Metals mimic airway epithelial injury induced by in vitro exposure to Utah Valley ambient particulate matter extracts. *J Toxicol Environ Health A* **66(12)** 1087-1112.

- Peters A, Doring A, Wichmann HE, Koenig W (1997a). Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet* **349(9065)** 1582-1587.
- Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J (1997b). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* **155(4)** 1376-1383.
- Pope CA 3rd, Bates DV, Raizenne ME (1995). Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environ Health Perspect* **103(5)** 472-480.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J Am Med Assoc* **287(9)** 1132-1141. Comment in: *J Am Med Assoc* 2002 Aug 21; 288 (7) 830; discussion 830.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ (2004). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* **109(1)** 71-77.
- Pope CA 3rd, Dockery DW, Spengler JD, Raizenne ME (1991). Respiratory health and PM10 pollution. A daily time series analysis. *J Am Med Assoc* **287(9)** 1132-1141. Comment in: *Am Rev Respir Dis* 144, 668-674.
- POST (1996). Parliamentary Office of Science and Technology (UK). Fine particles and Health - Technical report 82, June 1996. 12 pages.
- Prieditis H, Adamson IY (2002). Comparative pulmonary toxicity of various soluble metals found in urban particulate dusts. *Exp Lung Res* **28(7)** 563-76.
- Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* **61(5)** 442-447.
- Salnikow K, Li X, Lippmann M (2004). Effect of nickel and iron co-exposure on human lung cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **196(2)** 258-265.
- Samet JM (2000). What properties of particulate matter are responsible for health effects? *Inhalat Toxicol* **12 (Suppl. 1)** 19-21.
- Saxl O (2000). *Opportunities for Industry in the Application of Nanotechnology*. London, UK:Office of Science and Technology. [A report for The Institute of Nanotechnology, April 2000]. <http://www.nano.org.uk/contents.htm> (rapport non téléchargeable).
- Schimberg RW, Ukkonen A (2004). Ultrafine and fine particles in bronze foundries and in welding, in BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces", BIA-Report 7/2003e, pp. 169-177.
- Schwartz J, Dockery DW, Neas LM (1996). Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air Waste Manag Assoc* **46(10)** 927-939.
- Seagrave JC, Nikula KJ (2000). Multiple modes of responses to air pollution particulate materials in A549 alveolar type II cells. *Inhal Toxicol* **12 (Suppl. 4)**, 247-260.
- Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G, Kreyling WG (2004). Long-Term Clearance Kinetics of Inhaled Ultrafine Insoluble Iridium Particles from the Rat Lung, Including Transient Translocation into Secondary Organs. *Inhal Toxicol* **16(6-7)** 453-459.
- Service RF (2004). Nanotechnology grows up. *Science* **304**, 1732-1734.
- Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V, Baron P (2005). Unusual inflammatory and

- fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**(5) L698-708.
- Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P (2003). Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A* **66**(20) 1909-1926.
- Spiegel-Ciobanu VE (2004). Ultrafine particles created by welding, in BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces", BIA-Report 7/2003e, pp. 157-168.
- S&T Presse, le 25/09/2004 à 17h09 : L'avenir des nanotechnologies dans la lutte contre le cancer.
- Timbrell V, Ashcroft T, Goldstein B et al. (1988). Relationships between retained amphibole fibres and fibrosis in human lung tissue specimens. *Ann Occup Hyg* **32** (Suppl. 1), 323-340.
- Tinkle SS (2004). Dermal penetration of nanoparticles. Nanosymposium Report Buxton, pp. 47-52.
- Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Roberts JR, Salmen R, DePree K, Adkins EJ (2003). Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect* **111**(9) 1202-1208.
- Tissot S (1999). Toxicité des particules émises par la circulation automobile : suivi et synthèse bibliographique. Rapport final, INERIS, décembre 1999, 30 pages.
- Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD, Donaldson K (2000a). Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal Toxicol* **12**(12) 1113-1126.
- Tran CL, Buchanan D, Miller BG, Jones AD, Donaldson K (2000b). Mathematical modeling to predict the responses to poorly soluble particles in rat lungs. *Inhal Toxicol* **12** (Suppl. 3) 403-409.
- Valberg PA (2004). Is PM more toxic than the sum of its parts? Risk-assessment toxicity factors vs. PM-mortality "effect functions". *Inhal Toxicol* **16** (Suppl. 1), 19-29.
- Warheit D (2004). Nanoparticles: Health impacts? (The DuPont Company, Newark, DE, USA. Available online 23 January 2004. Materialstoday, <http://www.materialstoday.com/recentissues.htm>)
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR (2004). Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* **77**(1) 117-125.
- Wichers LB, Nolan JP, Winsett DW, Ledbetter AD, Kodavanti UP, Schladweiler MC, Costa DL, Watkinson WP (2004a). Effects of instilled combustion-derived particles in spontaneously hypertensive rats. Part I: Cardiovascular responses. *Inhal Toxicol* **16**(6-7) 391-405.
- Wichers LB, Nolan JP, Winsett DW, Ledbetter AD, Kodavanti UP, Schladweiler MC, Costa DL, Watkinson WP (2004b). Effects of instilled combustion-derived particles in spontaneously hypertensive rats. Part II: Pulmonary responses. *Inhal Toxicol* **16**(6-7) 407-419.
- Wichmann HE, Spix C, Tuch T, Wolke G, Peters A, Heinrich J, Kreyling WG, Heyder J (2000). Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany. Part I: Role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst* (98) 5-86; discussion 87-94.
- Wiessner JH, Henderson JD Jr, Sohnle PG (1988). The Effect of Crystal Structure on Mouse Lung Inflammation and Fibrosis. *Am Rev Res Dis* **138**(2) 445-450.

- Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V (2002). Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* **184(3)** 172-179.
- Wolff RK, Kanapilly GM, Griffis LC, Gray RH, McClellan RO (1980). Deposition And Retention Of Ultrafine Aggregated Aerosols In Beagle Dogs And Rats. Annual Report of the Inhalation Toxicology Research Institute, Lovelace Biomedical and Environmental Research Institute, Diel, J. H., D. E. Bice, and B. S. Martinez, Editors; pp. 225-229.
- Zimmer AT, Maynard AD (2002). Investigation of the aerosols produced by a high-speed, hand-held grinder using various substrates. *Ann Occup Hyg* **46(8)** 663-672.

Généralités sur les particules ultra-fines

1

1. Définition d'un aérosol ultra-fin

O. Witschger

Les effets sur la santé des particules inhalées dépendent de nombreux facteurs physiques et chimiques. L'un des facteurs physiques les plus importants, avec la concentration dans l'air, est la taille des particules, car elle détermine le site de dépôt dans les voies respiratoires et, au-delà, conditionne la façon dont les particules interagissent avec le système biologique.

Pour désigner les particules ultra-fines, la majorité des publications adopte comme gamme de taille celle comprise entre environ 1 nm et environ 100 nm. Dans le domaine des nanotechnologies, on parle également de « nanoparticules élaborées » (*engineered nanoparticles*) ou plus simplement de « nanoparticules » pour définir les particules volontairement élaborées par opposition à celles qui sont produites comme dérivé d'un processus (émissions secondaires). Deux exemples bien connus sont le soudage et la combustion. Les particules de ces émissions secondaires sont plutôt désignées par « particules ultra-fines » (voir chapitre 3, point 3 sur les différentes catégories de PUF en milieux professionnels). Lors de leur fabrication ou manipulation, les nanoparticules peuvent se trouver en suspension dans un gaz ou dans un liquide (par exemple sous la forme d'une suspension colloïdale) ; on les trouve également incluses dans une matrice solide ou de type sol-gel. Du point de vue de la santé, la limite de 100 nm est arbitraire : elle ne constitue pas une frontière entre ce qui serait moins nuisible (au-delà de 100 nm) et ce qui le serait davantage (en deçà de 100 nm), d'autant que, dans certains

environnements, des agglomérats ou agrégats de PUF (ou nanoparticules) solides se forment pour atteindre des dimensions de plus de 100 nm. C'est le cas des fumées de soudage pour les émissions secondaires ; on retrouve également des agglomérats composés de particules pouvant être inférieures à 100 nm dans les procédés de fabrication de poudres dites « ultra-fines ».

On emploie aussi le terme de « particule nanostructurée » pour désigner les agglomérats ou agrégats. Ce terme désigne (ISO, 2006) une particule avec des caractéristiques structurales inférieures à 100 nm qui peuvent influencer ses propriétés physiques, chimiques et/ou biologiques. Ces particules nanostructurées peuvent être de dimension sensiblement supérieure à 100 nm. Ainsi, un agglomérat de nanoparticules de diamètre 700 nm pourrait être considéré comme une particule nanostructurée ; de même, un agglomérat de PUF de dimension 400 nm prélevé dans une fumée de soudage ou de découpe laser est considéré comme une particule nanostructurée.

S'il n'existe pas, semble-t-il, de définition universelle, il y a consensus pour désigner par « agglomérat » un groupe de particules liées par des forces relativement faibles, notamment les forces de Van der Waals, des forces électrostatiques ou des forces développées par les tensions de surface (Friedlander, 2000). Lorsque les particules sont reliées entre elles par des ponts (visualisables par exemple en microscopie électronique) et qu'il devient difficile de discerner la forme exacte des particules primaires, on parle « d'agrégat ». Bien que les termes « agrégat » et « agglomérat » soient fréquemment utilisés de manière interchangeable, l'agrégat désigne plutôt un groupe de particules qu'il est difficile d'individualiser ; on utilise parfois le terme « agglomérats durs ». Dans la suite de l'ouvrage, ces deux termes sont employés de manière interchangeable, sauf mention contraire explicite.

Pour décrire les formes non sphériques, parfois complexes, des agglomérats ou agrégats, il est nécessaire de faire appel à la notion de dimension fractale. Ainsi, pour caractériser la morphologie d'une structure agglomérée, on fait souvent appel à un paramètre (D_f) qui lie une longueur caractéristique de cette structure à la taille moyenne des particules primaires qui la composent, ainsi qu'à leur nombre. Un agglomérat compact est caractérisé par un D_f tendant vers 3, tandis qu'un agglomérat plus ouvert (de type « chaîne ») est caractérisé par un D_f inférieur ou égal à 2 (voir chapitre 2, point 1).

Tout comme les définitions des trois fractions conventionnelles (inhalable, thoracique et alvéolaire) décrites dans la norme NF EN 481 (1993) pour les aérosols ambiants dans les atmosphères de travail, celle du terme « particule ultra-fine » ou « aérosol ultra-fin » devrait être, dans une certaine mesure, liée à la santé. Mais actuellement le niveau de connaissance est encore insuffisant pour dégager un consensus dans le cadre d'une future norme. Trois questions essentielles se posent :

– *Quel est le diamètre le plus approprié pour désigner les particules et leurs interactions avec les voies respiratoires ?*

Le diamètre n'est pas une mesure absolue des caractéristiques de la particule, car il dépend de la méthode de mesure. La pénétration et le dépôt au sein des voies respiratoires sont traditionnellement décrits au moyen du diamètre aérodynamique, diamètre équivalent de la particule sphérique de masse volumique égale à 1 g/cm^3 ayant la même vitesse limite de chute dans l'air calme que la particule considérée. Représentatif du comportement aérodynamique de la particule, ce diamètre est souvent employé pour caractériser des particules dont les diamètres sont supérieurs à environ $0,3 \mu\text{m}$, aux conditions atmosphériques normales de température et de pression. En dessous de cette valeur, le phénomène dominant le comportement de la particule est la diffusion brownienne (voir chapitre 3, point 1 sur le dépôt dans les voies respiratoires). Un diamètre relativement simple à mesurer, et qui représente bien le comportement de diffusion des particules, est le diamètre de mobilité électrique, diamètre équivalent de la particule sphérique portant une charge électrique élémentaire, et de même mobilité électrique que la particule considérée. Ce dernier serait alors mieux approprié aux PUF. Mais on ne connaît pas encore bien la pertinence de ce diamètre à représenter fidèlement le comportement des particules avec des formes et des densités très variées.

– *Quelle limite supérieure de taille adopter ?*

Comme précisé plus haut, la limite de 100 nm est arbitraire ; elle n'est par exemple pas liée au comportement des particules dans les voies respiratoires. Or, il est concevable d'adopter une définition qui serait basée sur la probabilité *de dépôt* (et non *de pénétration*) dans les voies respiratoires. La limite supérieure de la taille pourrait alors correspondre au minimum de dépôt (200 à 300 nm ; voir chapitre 3, figure 3.4). Mais, en deçà de cette limite, les propriétés physiques des particules sont modifiées et ne sont pas liées à la seule variation de leur taille.

– *Quelle signification donner aux agglomérats/agrégats de particules ultra-fines ?*

C'est une question importante puisque l'on ne sait pas à l'heure actuelle si, à volume égal de matériau, l'impact biologique de PUF individuelles est équivalent ou non à celui d'un agglomérat/agrégat de particules ultra-fines. Par exemple, si la réponse biologique est associée à la surface développée de l'aérosol déposé alors, pour un même volume, la réponse d'un agglomérat/agrégat caractérisé par une structure fractale ouverte ($D_f \leq 2$) devrait être similaire à celle d'une dose équivalente de particules individuelles, toutes choses égales par ailleurs (notamment le site de dépôt). En revanche, si le diamètre des particules pilote l'interaction biologique, comme cela semble être le cas pour les phénomènes de translocation récemment observés (Oberdörster et coll., 2004 ; Semmler et coll., 2004), l'impact risque d'être tout à fait différent selon qu'il s'agit d'agglomérats ou d'agrégats, qui ne se délitent pas une fois déposés.

Dans l'état actuel des connaissances, ces questions restent en suspens. Dans le contexte de cet ouvrage, à savoir le risque pour la santé au travail des PUF (nanoparticules) dispersées dans l'air au voisinage des voies respiratoires, on peut définir un aérosol

ultra-fin comme composé de PUF individuelles, ou sous forme d'agglomérats (ou d'agrégats). Le terme « aérosol ultra-fin » est plutôt consacré aux particules issues d'émissions secondaires (fumée, combustion) tandis que celui de « nanoaérosol » est plutôt réservé au contexte des nanotechnologies (voir le chapitre 2.3). On peut admettre que les dénominations « particule ultra-fine » et « nanoparticule » sont équivalentes. Le diamètre nominal d'une PUF (ou d'une nanoparticule), quel qu'il soit (géométrique, aérodynamique, de mobilité, ou autre), est inférieur à environ 0,1 μm ou 100 nm.

Au final, dans le contexte du risque pour la santé humaine, il est raisonnable de considérer le domaine submicronique dans son ensemble dès lors qu'il est question d'aérosols ultra-fins, en y intégrant les particules individuelles (de dimension nominale inférieure à 100 nm) et les agglomérats. Le domaine d'étude des aérosols ultra-fins s'étend donc sur trois ordres de grandeurs, entre environ 1 nm et environ 1 μm (1 000 nm).

Ces propositions reprennent celles d'un groupe de travail international réunissant notamment des scientifiques du National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH, États-Unis), du Health and Safety Laboratory (HSL, Grande-Bretagne), du Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz (BGIA, Allemagne) et de l'INRS. Le travail de ce groupe fait l'objet d'un rapport technique ISO (2006).

Bibliographie

- Friedlander SK (2000). *Smoke, Dust, and Haze. Fundamentals of aerosol dynamics*. 2nd edition. Oxford University Press, New York, 407 pages.
- ISO (2006). *Workplace Atmospheres – Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosols – Exposure characterization and assessment*. International Standards Organization, Geneva, Switzerland. Document n°. ISO/TC 146/SC 2/WG1 N324, 32 pages.
- NF EN 481 (1993 indicX43-276) – *Atmosphères des lieux de travail. Définitions des fractions de taille pour le mesurage des particules en suspension dans l'air*. Paris, AFNOR, novembre 1993, 16 pages.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* **16**, 437-445.
- Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G, Kreyling WG (2004). Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine soluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol* **16**, 453-459.

2. Comportement physique des particules ultra-fines (PUF)

F. Gensdarmes

Introduction

D'une façon générale, un aérosol est défini comme étant une suspension de particules liquides ou/et solides dans un gaz et ayant une vitesse limite de chute négligeable. Cette exigence sur la vitesse limite de chute conduit à restreindre le domaine de dimension des particules à des tailles inférieures à 100 μm pour le cas de l'air, dans les conditions normales de pression et de température. Pour définir une limite inférieure de dimension des particules, il est nécessaire de se baser sur des considérations thermodynamiques afin de distinguer les molécules composant le gaz et les nanoparticules. Par exemple, on peut considérer la transition molécules gazeuses - particules en considérant le dépôt sur les surfaces solides. En l'absence de phénomène d'adsorption, on considère généralement qu'une particule qui entre en contact avec une surface solide reste déposée principalement du fait des forces de Van der Waals, tandis d'une molécule gazeuse rebondit. Néanmoins, pour certaines conditions thermodynamiques, on suppose qu'il peut exister un phénomène de rebond thermique qui perturbe le dépôt des nanoparticules sur les surfaces. En conséquence, un critère de dépôt sur les surfaces ne suffit pas à établir une limite inférieure de taille des particules. Pour préciser cette limite, on peut considérer les mécanismes de formation des particules, notamment la nucléation homogène et la nucléation hétérogène, qui décrivent la formation d'agrégats moléculaires stables dans certaines conditions de saturation de vapeur. En effet, dans le cas de la nucléation hétérogène, des particules stables composées de quelques dizaines de molécules résultent par exemple de l'agglomération de molécules d'eau sur un ion. Ces agrégats ont des tailles de quelques dixièmes de nanomètre. Finalement, il n'est pas possible de définir strictement une limite inférieure de taille pour des particules en suspension dans un gaz, notamment en termes de diamètre.

Cette partie présente d'une façon générale et non exhaustive le comportement spécifique des particules ultra-fines. Des indications très détaillées sur la physique de ces particules peuvent être trouvées dans les ouvrages en français de Bricard (1977a, 1977b), Renoux et Boulaud (1998, 2003a, 2003b) et dans les ouvrages en anglais de Williams et Loyalka (1991), Hinds (1999), Baron et Willeke (2001).

2.1. Domaine moléculaire

Le spectre de dimensions des particules pouvant composer un aérosol s'étend donc entre quelques dixièmes de nanomètre jusqu'à cent micromètres. Pour déterminer la

résistance du milieu gazeux au mouvement d'une particule, on considère le rapport entre le libre parcours moyen des molécules qui composent le gaz (λ_g) et le rayon des particules supposées sphériques (r_p), nombre sans dimension appelé nombre de Knudsen ($Kn = \lambda_g/r_p$). Ce nombre caractérise la continuité du milieu par rapport à la particule. Ainsi, lorsque $Kn \ll 1$, on considère que le milieu est continu, la résistance du milieu au mouvement d'une particule peut être exprimée en fonction des paramètres macroscopiques du gaz (masse volumique ρ_g , viscosité dynamique η). En revanche, lorsque $Kn \gg 1$, on considère le milieu comme discontinu ; c'est le domaine moléculaire. Dans ce cas, le mouvement d'une particule est affecté par les collisions individuelles avec les molécules du gaz environnant ; on dit que les particules sont soumises au mouvement brownien. La résistance du milieu au mouvement d'une particule est alors fonction de l'agitation thermique, de la masse et de la concentration des molécules gazeuses. Lorsque $Kn \approx 1$ (en pratique $0,4 < Kn < 20$; Baron et Willeke, 2001) le domaine est dit domaine intermédiaire.

De façon pratique, le libre parcours moyen des molécules composant l'air à 101,3 kPa (1 atm) et 293 K (20 °C) est égal à 0,066 μm ; on peut considérer que l'on quitte le domaine continu lorsque le diamètre des particules est inférieur à 1 μm et que l'on atteint le domaine moléculaire lorsque le diamètre des particules est inférieur à 0,1 μm (100 nm). À titre de comparaison, le diamètre moléculaire qui représente la distance entre les centres de deux molécules au moment de leur collision est égal à 0,37 nm.

Le tableau 1.I présente différentes dimensions caractéristiques du domaine moléculaire pour l'air à 101,3 kPa et 293 K (Hinds, 1999).

	Grandeur caractéristique
Diamètre moléculaire	0,37 nm
Libre parcours moyen	66 nm
Concentration de molécules	$2,5 \cdot 10^{19} \text{ cm}^{-3}$
Vitesse moyenne d'agitation des molécules	460 m.s ⁻¹

Tableau 1.I. Grandeurs caractéristiques du domaine moléculaire pour l'air.

Afin d'utiliser une formulation unique dans les différents domaines (continu, intermédiaire et moléculaire) pour décrire la résistance du milieu au mouvement d'une particule, on introduit le facteur de correction de Cunningham. Dans le domaine moléculaire, ce facteur traduit la diminution de la force de frottement du gaz sur une sphère en mouvement par rapport à la force calculée selon la loi du domaine continu, dite loi de Stokes. Cette réduction du frottement est souvent imagée en considérant que les molécules peuvent « glisser » à la surface de la particule au lieu d'entrer en collision avec elle.

Dans le domaine continu, la force globale de frottement de l'air sur une sphère de diamètre d_p , encore appelée force de traînée, s'exprime par :

$$F_t = 3\pi\eta Vd_p, \quad (1)$$

où η représente la viscosité dynamique du fluide ($1,81 \times 10^{-5}$ Pa.s pour l'air à 293 K), V la vitesse relative de la particule par rapport au fluide ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Cette loi est valable seulement lorsque l'écoulement autour de la sphère est laminaire, c'est-à-dire lorsque le nombre de Reynolds de la particule (défini par $Re_p = \rho_g Vd_p / \eta$) est inférieur à 0,1.

En utilisant le facteur de correction de Cunningham, la force de traînée s'exprime dans tous les régimes par la relation :

$$F_t = \frac{3\pi\eta Vd_p}{Cu(Kn)}. \quad (2)$$

Ce facteur, fonction du nombre de Knudsen, est déterminé par des équations empiriques établies à partir de données expérimentales (Allen et Raabe 1982, 1985 ; Rader, 1990). Dans ces études, les particules utilisées ont des dimensions de l'ordre du micromètre et les auteurs font varier la pression du gaz afin d'étudier une gamme de nombres de Knudsen compris entre 10^{-2} et 10^3 . Récemment, Kim et coll. (2005) ont réalisé des mesures du facteur de correction de Cunningham à la pression atmosphérique pour des particules sphériques de diamètre 20 nm, avec une analyse détaillée des incertitudes de mesure. Leurs résultats indiquent un bon accord général avec les précédentes études.

De façon pratique, on exprime ce facteur à 293 K en fonction de la pression du gaz, qui détermine alors le libre parcours moyen, et du diamètre des particules. La relation communément employée pour l'air (Hinds 1999, Baron et Willeke 2001) est définie par :

$$Cu = 1 + \frac{1}{P \cdot d_p} \cdot [15,60 + 7,00 \cdot \exp(-0,059 \cdot P \cdot d_p)] \quad (3)$$

où P représente la pression absolue de l'air (kPa) et d_p le diamètre de la particule (μm).

À titre d'exemple, le tableau 1.II présente les valeurs des facteurs de correction de Cunningham calculés pour $P = 101,3$ kPa et pour différents diamètres de particules.

Diamètre (μm)	Facteur de correction de Cunningham
0,005	45,21
0,01	22,91
0,05	5,11
0,1	2,92
1	1,15
10	1,02

Tableau 1.II. Valeurs du facteur de correction de Cunningham pour quelques diamètres de particules.

2.2. Mouvement des particules

2.2.1. Action de la pesanteur : la sédimentation

La sédimentation d'une particule dépend du rapport entre la force de pesanteur exercée sur la particule et la force de traînée, qui s'oppose au mouvement de cette particule. Dans des conditions environnementales stables, la particule acquiert une vitesse limite de sédimentation. Pour une particule sphérique de diamètre d_p et de masse volumique ρ_p cette vitesse s'exprime par :

$$V_s = \frac{\rho_p \cdot d_p^2 \cdot Cu(d_p) \cdot g}{18 \cdot \eta}, \quad (4)$$

où g représente l'accélération de la pesanteur ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$). Cette relation est valable seulement lorsque l'écoulement autour de la sphère est laminaire, c'est-à-dire lorsque le nombre de Reynolds de la particule est inférieur à 0,1.

Dans le cas général où les particules ne sont pas sphériques, la vitesse de sédimentation s'exprime en fonction du diamètre équivalent en volume de la particule d_{ev} par la relation :

$$V_s = \frac{\rho_p \cdot d_{ev}^2 \cdot Cu(d_{ev}) \cdot g}{18 \cdot \eta \cdot \chi}, \quad (5)$$

où d_{ev} représente le diamètre de la sphère qui a le même volume que la particule considérée et χ le facteur de forme dynamique de cette particule. Ce facteur, sans dimension, est égal au rapport de la force de traînée exercée sur la particule à la force de traînée exercée sur une sphère de même volume que la particule. En conséquence, pour des particules sphériques, le facteur de forme dynamique est égal à 1.

En physique et métrologie des aérosols, on utilise couramment un diamètre équivalent des particules, appelé diamètre aérodynamique. Le diamètre aérodynamique d'une particule (sphérique ou non sphérique) est défini comme le diamètre de la sphère de masse volumique égale à $1\,000\text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ et de même vitesse limite de sédimentation que la particule. Ainsi la vitesse de sédimentation d'une particule quelconque s'exprime simplement en fonction de son diamètre aérodynamique d_a par la relation :

$$V_s = \frac{\rho_0 \cdot d_a^2 \cdot Cu(d_a) \cdot g}{18 \cdot \eta}, \quad (6)$$

où ρ_0 représente la masse volumique de référence, égale à $1\,000\text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

Pour exprimer cette vitesse de sédimentation, on peut également utiliser le diamètre de Stokes, diamètre de la sphère de même masse volumique et de même vitesse limite de sédimentation que la particule considérée. La vitesse de sédimentation d'une particule quelconque s'exprime alors en fonction de sa masse volumique ρ_p et de son diamètre de Stokes d_s par la relation :

$$V_s = \frac{\rho_p \cdot d_s^2 \cdot Cu(d_s) \cdot g}{18 \cdot \eta} \quad (7)$$

La figure 1.1, inspirée de Hinds (1999), donne différents diamètres équivalents utilisés pour représenter la sédimentation d'une particule de forme quelconque à $T = 293$ K et $P = 1\,013$ hPa.

Particule non sphérique

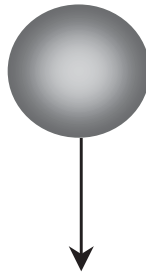
$$\begin{aligned} d_{ev} &= 5,0 \, \mu\text{m} \\ \rho_p &= 4000 \, \text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \\ \chi &= 1,36 \end{aligned}$$



$$V_s = 2,2 \, \text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$$

Diamètre de Stokes

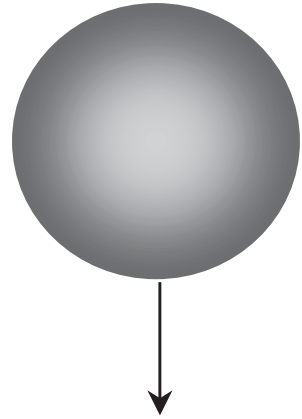
$$\begin{aligned} d_s &= 4,3 \, \mu\text{m} \\ \rho_p &= 4000 \, \text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \\ \chi &= 1 \end{aligned}$$



$$V_s = 2,2 \, \text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$$

Diamètre aérodynamique

$$\begin{aligned} d_a &= 8,6 \, \mu\text{m} \\ \rho_0 &= 1000 \, \text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \\ \chi &= 1 \end{aligned}$$



$$V_s = 2,2 \, \text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$$

Figure 1.1. Schéma descriptif de différents diamètres équivalents (Hinds, 1999).

La sédimentation est un mécanisme important dans l'évolution d'un aérosol de taille supermicronique ; en revanche, elle est généralement négligée pour un aérosol sub-micronique. À titre d'exemple, le tableau 1.III présente la vitesse de sédimentation en fonction du diamètre aérodynamique des particules à $P = 1\,013$ hPa et $T = 293$ K.

Diamètre aérodynamique (μm)	Vitesse de sédimentation (cm.s ⁻¹)
0,005	$3,4 \times 10^{-6}$
0,01	$6,9 \times 10^{-6}$
0,05	$3,9 \times 10^{-5}$
0,1	$8,8 \times 10^{-5}$
1	$3,5 \times 10^{-3}$
10	$3,1 \times 10^{-1}$

Tableau 1.III. Vitesse de sédimentation pour quelques diamètres aérodynamiques de particules.

2.2.2. Diffusion brownienne

Le mouvement brownien, encore appelé diffusion brownienne, est la trajectoire aléatoire d'une particule sous l'effet de ses collisions avec les molécules gazeuses environnantes.

La diffusionphorèse est le mouvement d'une particule sous l'action d'un gradient de concentration d'une espèce gazeuse, par exemple la vapeur d'eau. Ce mouvement est toujours orienté de la zone de concentration élevée vers la zone de concentration faible. La diffusionphorèse est généralement caractérisée par la loi de Fick, qui permet d'exprimer le flux de particules en fonction de leur coefficient de diffusion et de leur concentration. En l'absence de forces extérieures, ce dernier est exprimé par :

$$J = -D \cdot \frac{dC}{dx}, \quad (8)$$

où J représente le flux de particules par unité de surface (m⁻².s⁻¹), D le coefficient de diffusion brownienne des particules (m².s⁻¹) et C la concentration des particules (m⁻³).

Le coefficient de diffusion brownienne D d'une particule sphérique de diamètre d_p est donné par :

$$D = \frac{k \cdot T \cdot Cu(d_p)}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_p}, \quad (9)$$

où k représente la constante de Boltzmann ($k = 1,38 \times 10^{-23}$ J.K⁻¹) et T la température (K).

S'il n'existe pas de gradient de concentration en particules, la diffusionphorèse est nulle, il n'y a pas de transfert de masse particulaire dans une direction privilégiée. Néanmoins, les particules sont quand même animées d'un mouvement brownien, caractérisé par le déplacement quadratique moyen des particules x_{rms} . Ce déplacement correspond à la

distance totale parcourue en moyenne par la particule dans une direction pendant un temps t . Il s'exprime par :

$$x_{rms} = \sqrt{2 \cdot D \cdot t}. \quad (10)$$

Cette relation montre que le mouvement brownien d'une particule est d'autant plus important que son coefficient de diffusion est grand et son diamètre petit. En conséquence, ce mouvement est souvent prédominant dans le comportement physique des particules ultra-fines.

Ce fait est illustré sur la figure 1.2, qui compare le déplacement quadratique moyen d'une particule en 1 s et sa vitesse de sédimentation. Les résultats présentés sont obtenus pour des particules sphériques de densité égale à 1 et à $P = 1\,013$ hPa et $T = 293$ K.

Cette figure montre clairement que, pour les particules de diamètre supérieur à $1\ \mu\text{m}$, la sédimentation est responsable du déplacement des particules ; en revanche, lorsque le diamètre des particules est inférieur à $0,1\ \mu\text{m}$, c'est le mouvement brownien. Elle montre également que le déplacement brownien s'effectue à une l'échelle micrométrique ou millimétrique ; c'est donc un phénomène important dans les situations où les distances mises en jeu sont petites et les temps de séjour longs. Il est important de noter que le déplacement brownien des particules ultra-fines reste très faible devant leur transport par les mouvements de convection de l'atmosphère. Ces mouvements de convection peuvent résulter d'écarts de température et du vent dans l'atmosphère, ou bien des systèmes de ventilation, du déplacement de personnes ou d'objets dans les environne-

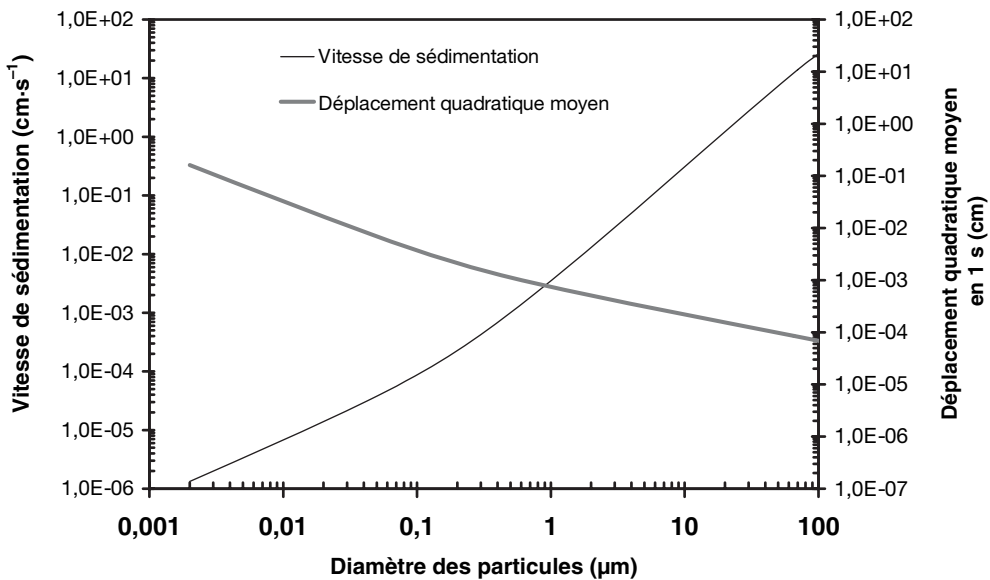


Figure 1.2. Comparaison du déplacement quadratique moyen et de la vitesse de sédimentation des particules.

ments intérieurs. Ces mouvements induisent un transport et une dispersion des particules à l'échelle macroscopique, généralement caractérisée par un coefficient de diffusion turbulente qui peut être de l'ordre de $10^{-3} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, donc beaucoup plus important que le coefficient de diffusion brownienne d'une particule (tableau 1.IV).

Diamètre (μm)	Coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
0,005	$2,15 \times 10^{-7}$
0,01	$5,45 \times 10^{-8}$
0,05	$2,43 \times 10^{-9}$
0,1	$6,94 \times 10^{-10}$
1	$2,74 \times 10^{-11}$
10	$2,41 \times 10^{-12}$

Tableau 1.IV. Coefficient de diffusion brownienne d'une particule supposée sphérique à $P = 1\,013 \text{ hPa}$ et $T = 293 \text{ K}$.

2.2.3. Action d'un champ électrique

Lorsqu'une particule électriquement chargée est soumise à un champ électrique externe, elle acquiert une vitesse de dérive fonction de l'équilibre entre les forces électrique et de traînée :

$$V = Z \cdot E, \quad (11)$$

où E représente le champ électrique ($\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$) et Z la mobilité électrique de la particule ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

La mobilité électrique d'une particule est reliée à son coefficient de diffusion par la relation :

$$Z = \frac{p \cdot e}{k \cdot T} \cdot D, \quad (12)$$

où p représente le nombre de charges élémentaires portées par la particule et e la charge élémentaire ($e = 1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$).

En utilisant la définition du coefficient de diffusion, on exprime la mobilité d'une particule supposée sphérique en fonction de son diamètre dp par :

$$Z = \frac{p \cdot e \cdot Cu}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot dp}. \quad (13)$$

Cette relation montre que plus la particule est petite, plus sa mobilité électrique est grande. En conséquence, les particules ultra-fines électriquement chargées ont un

comportement très différent des particules neutres lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique.

La figure 1.3 illustre ce fait en comparant déplacement quadratique moyen par diffusion brownienne et vitesse de dérive des particules pour deux valeurs de champ électrique ; les particules sont supposées sphériques et porter une seule charge électrique élémentaire. Les calculs sont effectués pour un champ électrique $E = 100 \text{ V.m}^{-1}$, représentatif du champ électrique atmosphérique au niveau du sol dans des conditions de beau temps, et pour un champ électrique $E = 10 \text{ kV.m}^{-1}$, représentatif de conditions d'orage (Chalmers 1967 ; Few et coll. 1999).

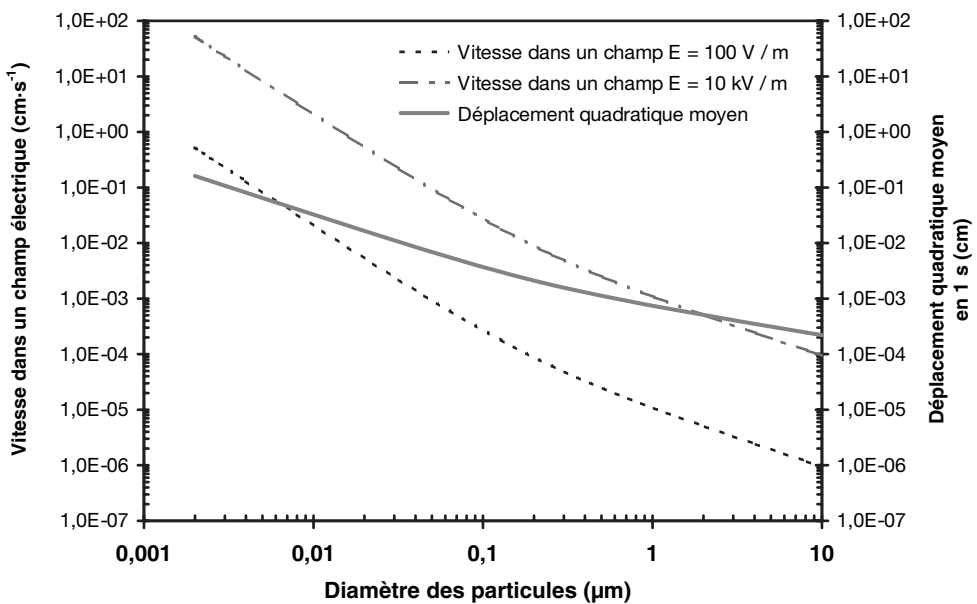


Figure 1.3. Comparaison du déplacement quadratique moyen et de la vitesse de dérive dans un champ électrique à $P = 1\,013 \text{ hPa}$ et $T = 293 \text{ K}$, pour une particule monochargée.

Cette figure montre clairement que le déplacement de PUF électriquement chargées est considérablement influencé par un champ électrique. Dans l'atmosphère, les champs électriques résultent principalement des conditions météorologiques de la troposphère et de la conductibilité électrique de l'air, due à la présence de petits ions (Chalmers 1967 ; Bering et coll. 1998) ; il existe également des champs électriques intenses à proximité des lignes à haute tension.

Dans les environnements intérieurs, des champs électriques peuvent résulter de mécanismes de frottement ou de contact (frottement de l'air sur une surface, frottement ou contact entre deux surfaces). Un champ électrique peut également être créé par

l'apparition d'une charge d'espace, laquelle peut résulter d'une charge électrique globale de l'aérosol différente de zéro ou bien de l'évolution des ions présents dans le gaz.

Un autre effet électrostatique peut notamment contribuer au dépôt des particules : la force image. Lorsqu'une particule électriquement chargée est à une distance x d'une surface conductrice, il apparaît une charge de signe opposé à une distance $-x$ de la surface et une force d'attraction coulombienne, la force image F_i , qui s'exprime par :

$$F_i = \frac{p^2 \cdot e^2}{16 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot x^2}, \quad (14)$$

où p représente le nombre de charges élémentaires portées par la particule, e la charge élémentaire ($e = 1,6 \times 10^{-19}$ C), ϵ_0 la permittivité du vide ($\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12}$ F.m⁻¹) et x la distance entre la particule et la surface (m).

Cette force image est d'autant plus élevée que la distance entre la particule et la surface est faible et que la charge électrique de la particule est grande. La vitesse de déplacement de la particule sous l'action de la force image s'exprime par :

$$V_i = Z \cdot \frac{p \cdot e}{16 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot x^2}. \quad (15)$$

Pour illustrer l'effet de la force image, la figure 1.4 compare le déplacement quadratique moyen en 1 s et la vitesse de déplacement par force image pour des particules portant 10 charges électriques élémentaires et situées à des distances égales à 1 mm et 0,1 mm de la surface.

La figure 1.4 montre que l'effet de la force image sur le déplacement des particules est, en général, négligeable devant le mouvement brownien. En effet, pour des particules portant 10 charges élémentaires et situées à une distance égale à 0,1 mm de la surface, on constate que la vitesse de déplacement par force image est toujours inférieure d'un facteur 10 au déplacement quadratique moyen en 1 s. Néanmoins, dans certaines situations, l'effet de la force image sur le dépôt des particules peut s'avérer important ; par exemple, dans le cas de particules fortement chargées ou de distances particules-surfaces très petites. Le cas de petites distances entre les particules et les surfaces se rencontre, par exemple, lors de la pénétration des aérosols dans les voies respiratoires. Dans cette situation, plusieurs études montrent une augmentation du dépôt des particules chargées par rapport aux particules neutres (Melandri et coll., 1983, Cohen et coll. 1996).

Les mécanismes de production des aérosols conduisent fréquemment à l'obtention de particules électriquement chargées. Cette charge électrique évolue en fonction des collisions avec des petits ions positifs ou négatifs présents dans le gaz. Dans l'atmosphère, ces petits ions sont créés majoritairement par la désintégration du radon, gaz radioactif naturellement présent dans l'environnement, et par l'action des rayonnements cosmiques (Bricard et Pradel, 1966). Lorsque les concentrations en ions positifs et en ions

negatifs sont egales, ainsi que leurs mobilités electriques, la charge electrique moyenne à l’équilibre des particules composant l’aérosol est égale à zéro : on dit que l’aérosol est électriquement neutralisé. Néanmoins, les particules sont individuellement chargées suivant une loi de répartition gaussienne appelée équilibre de Boltzmann (Lissowski, 1940 ; Keefe et coll., 1959). Le tableau 1.V présente, à l’équilibre de Boltzmann, les fractions de particules portant un nombre de charges élémentaires donné en fonction de leur diamètre.

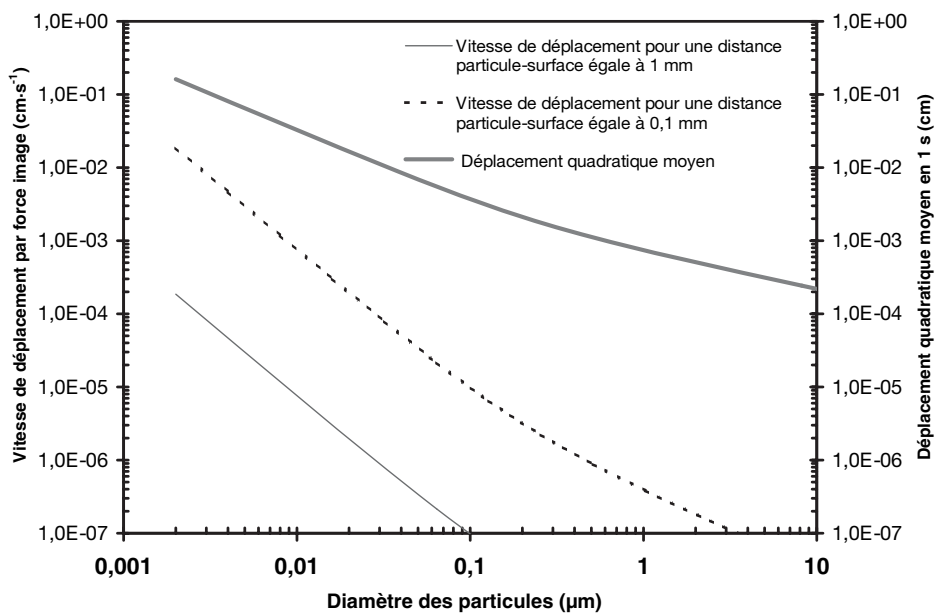


Figure 1.4. Comparaison du déplacement quadratique moyen et de la vitesse de déplacement par force image pour des particules portant 10 charges élémentaires.

Nombre de charges électriques élémentaires									
Diamètre (μm)	< -3	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	> +3
0,1		0,3	4,4	24,1	42,6	24,1	4,4	0,3	
0,5	4,6	6,8	12,1	17,0	19,0	17,0	12,1	6,8	4,6
1	11,8	8,1	10,7	12,7	13,5	12,7	10,7	8,1	11,8
5	29,8	5,4	5,8	6,0	6,0	6,0	5,8	5,4	29,8
10	35,4	4,0	4,2	4,2	4,3	4,2	4,2	4,0	35,4

Tableau 1.V. Pourcentage de particules portant le nombre indiqué de charges électriques élémentaires à l’équilibre de Boltzmann.

Ce tableau montre que, même si l'aérosol est globalement neutre, les particules sont chargées positivement ou négativement. Par ailleurs, on constate que la fraction de particules neutres augmente sensiblement lorsque le diamètre des particules diminue. Dans le cas des PUF (diamètre inférieur à 0,1 μm), la loi d'équilibre de Boltzmann sous-estime la fraction de particules électriquement chargées. Fuchs (1963), Hoppel et Frick (1986), puis Wiedensohler (1988) ont proposé des théories permettant de comprendre et de décrire l'état de charge électrique des PUF en présence de petits ions positifs et négatifs. Le tableau 1.VI présente les fractions de PUF portant +1 ou -1 charge électrique, calculées à l'aide de la représentation de Wiedensohler (1988), également décrite par Flagan (2001), ainsi que la fraction correspondant au calcul effectué d'après l'équilibre de Boltzmann. Ces calculs ont été validés expérimentalement par Wiedensohler (1988) et Reischl et coll. (1996) pour des particules de diamètres supérieurs à 2,4 nm.

Le tableau 1.VI permet de constater qu'en présence d'ions bipolaires, seule une petite fraction des PUF est chargée (inférieure à 10 % pour les particules de 10 nm). En conséquence, même si les forces électriques exercées sur ces particules sont grandes, elles ne concernent qu'une faible fraction de la population. Il existe cependant des situations où les PUF peuvent être plus fortement chargées, par exemple en présence d'ions unipolaires, d'un champ électrique ou d'un rayonnement ultra-violet.

Diamètre (μm)	Pourcentage de particules portant +1 ou -1 charge électrique élémentaire	
	Calcul de Wiedensohler	Équilibre de Boltzmann
0,005	4,1	0,004
0,01	9,3	0,9
0,05	39,2	38,6
0,1	49,3	48,2

Tableau 1.VI. Fractions de particules chargées en présence d'ions bipolaires pour le cas des aérosols ultra-fins.

2.3. Coagulation des particules

La coagulation est un processus d'adhésion, de fusion ou de coalescence d'une particule avec une autre ; c'est donc un processus important pour comprendre l'évolution d'un aérosol lorsque la probabilité de rencontre entre deux particules est élevée, c'est-à-dire, en pratique, lorsque la concentration est supérieure à 10^6 cm^{-3} . La coagulation entraîne une baisse de la concentration en nombre des particules et une augmentation du diamètre médian en nombre de l'aérosol. Il en existe différents types :

- la coagulation thermique ou brownienne (rencontre par mouvement brownien) ;

– la coagulation turbulente concerne toutes les tailles de particules ; elle est due aux différences de vitesses entre particules dans les écoulements turbulents qui peuvent conduire à leur interception ;

– la coagulation turbulente inertielle concerne les aérosols contenant des particules dont l'inertie n'est pas négligeable. Lorsque des particules ayant des temps de relaxation différents sont présentes dans un tourbillon, leur mouvement relatif peut entraîner leur collision.

De plus, l'action de forces ou de champs extérieurs peut influencer significativement la coagulation d'un aérosol, comme les forces électrostatiques ou les champs acoustiques.

La collision entre deux particules ne conduit pas nécessairement à leur coagulation : il est donc nécessaire d'introduire une efficacité de collision, sous la forme d'un coefficient de coagulation K , défini par le nombre de chocs se produisant par unité de temps pour une concentration de 1 m^{-3} ; il s'exprime en $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

Si l'on considère que l'aérosol est constitué de particules de même diamètre, l'évolution de la concentration C de ces particules par coagulation est décrite par la relation :

$$\frac{dC}{dT} = K \cdot C^2, \quad (16)$$

dont la solution est donnée par :

$$C(t) = \frac{C_0}{1 + C_0 \cdot K \cdot t}, \quad (17)$$

où C_0 représente la concentration en nombre des particules à $t = 0$.

En régime continu ($Kn \ll 1$), le coefficient de coagulation s'exprime par :

$$K = 4 \cdot \pi \cdot d_p \cdot D = \frac{4 \cdot k \cdot T \cdot Cu(d_p)}{3 \cdot \eta}, \quad (18)$$

où K représente la constante de Boltzmann ($k = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$), T la température (K), D le coefficient de diffusion brownienne des particules ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et η la viscosité dynamique du fluide ($\text{Pa} \cdot \text{s}$).

En pratique, les particules de diamètre supérieur à $0,4 \mu\text{m}$ à $T = 293 \text{ K}$ et $P = 1\,013 \text{ hPa}$ relèvent du régime continu. Pour les particules supérieures à $1 \mu\text{m}$, le coefficient de correction de Cunningham est proche de 1, et on peut considérer que le coefficient de coagulation est indépendant de leur taille, et égal à $3 \times 10^{-16} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ à $T = 293 \text{ K}$ et $P = 1\,013 \text{ hPa}$.

Dans les régimes transitoire et moléculaire, il faut introduire un coefficient de correction pour tenir compte des trajectoires rectilignes des particules lorsqu'elles sont inférieures au libre parcours moyen (théorie de la sphère limite). Dans ce cas, le coefficient de coagulation est défini par :

$$K = 4 \cdot \pi \cdot d_p \cdot D \cdot \beta, \quad (19)$$

où β représente un facteur correctif issu des travaux de Fuchs (1964). Ce facteur est compris entre 0,04 et 1 pour des diamètres respectivement compris entre 4 nm et 1 μm (Hinds, 1999).

La relation 16 montre que la coagulation dépend de la concentration initiale de l'aérosol. Le tableau 1.VII présente le temps nécessaire pour diminuer la concentration d'un aérosol supposé monodispersé d'un facteur 2 en fonction de différentes concentrations initiales. Ce temps caractéristique est égal à $1/C_0K$ (voir équation 17). Le coefficient de coagulation est ici supposé égal à $10^{-15} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, correspondant à un système composé de particules sphériques de 50 nm.

Comme la coagulation dépend de la concentration de l'aérosol, et que la fréquence de collision devient de plus en plus faible quand la concentration de l'aérosol décroît, on admet que la distribution granulométrique d'un aérosol qui évolue par coagulation atteint un stade appelé « auto-préservation », dans lequel sa granulométrie générale n'évolue que très lentement.

Concentration initiale C_0 (cm^{-3})	Temps nécessaire pour obtenir $C_0/2$
10^{12}	1 ms
10^{10}	0,1 s
10^8	10 s
10^6	16 min 40 s
10^4	27 h 46 min 40 s

Tableau 1.VII. Temps nécessaire pour diminuer la concentration initiale d'un facteur 2 par coagulation.

Cette approche simple de la coagulation ne permet pas de rendre compte du cas d'un aérosol polydispersé, mais fournit une indication du temps de coagulation en fonction de la concentration de l'aérosol. Le cas d'un aérosol polydispersé est traité en détail par Park et coll. (1999) et les effets liés à la turbulence par Park et coll. (2002).

Dans l'ensemble de ces études sur la coagulation, on considère que les particules d'origine sont sphériques et que les nouvelles particules résultant de la coagulation sont également sphériques. Cette description sous-entend que les particules fusionnent complètement ou coalescent. Dans le cas d'une coagulation entre particules solides formant des agrégats, on utilise également le terme d'agglomération ou d'agrégation. Le comportement physique des agrégats est notablement différent de celui des particules sphériques. À l'heure actuelle, les études sur la dynamique des agrégats sont en plein essor, et encore stimulées par le développement de nouvelles techniques de caractérisation de leur morphologie, notamment la théorie fractale. La caractérisation et la compréhension de la formation et du comportement de ces particules trouvent de nombreuses

applications dans les domaines de la combustion ou la synthèse de nanomatériaux. Friedlander (2000) présente en détail l'état des connaissances sur le comportement spécifique des agrégats par rapport à celui des particules sphériques, et Baron et coll. (2001) les méthodes de caractérisation de la morphologie fractale des agrégats (dimension fractale, rayon de giration, diamètre et nombre des particules primaires ; voir chapitre 2, point 1).

Les agrégats peuvent avoir des comportements spécifiques par rapport aux particules sphériques. Par exemple, pour la coagulation entre agrégats de même masse, Friedlander (2000) montre que le coefficient de coagulation peut être 12 fois plus élevé que pour des particules sphériques de masse équivalente. Pour ce cas, il considère des agrégats composés de particules primaires de 4 nm avec un rayon de giration de 40 nm et une dimension fractale égale à 2. Cette différence entre les coefficients de coagulation s'explique par des sections efficaces de collision beaucoup plus élevées pour les agrégats que pour des sphères de masse équivalente. De ce fait, le temps nécessaire pour atteindre la distribution d'auto-préservation est plus court pour les agrégats, et il évolue en fonction de leur dimension fractale.

2.4. Les phénomènes de nucléation, d'évaporation et de condensation

La nucléation conduit à la formation de particules à partir d'une phase gazeuse. Il en existe différents types : la nucléation homogène, la nucléation induite par les ions et la nucléation hétérogène.

La nucléation homogène se produit dans des conditions de vapeur sursaturée (la pression partielle P de l'espèce considérée dans le gaz est supérieure à sa pression de vapeur saturante P_s). On définit le rapport de sursaturation par :

$$S = \frac{P}{P_s}. \quad (20)$$

Dans le gaz, sous l'effet de l'agitation thermique et des forces de Van der Waals, il se forme en permanence des clusters, agrégats composés de quelques molécules, par exemple des molécules d'eau. Ces clusters sont instables, ils se forment et disparaissent en permanence. Lorsque le rapport de saturation augmente, leur taux de formation, leur concentration et leur probabilité de collision augmentent et ils peuvent atteindre une taille suffisante pour devenir stables. Cette taille critique atteinte, ils grossissent par condensation. Pour une espèce et une température donnée, il existe un rapport de saturation critique au-delà duquel on observe la nucléation homogène. Les rapports de saturation critique varient typiquement entre 2 et 10 suivant les espèces et les températures considérées. Le tableau 1.VIII, emprunté à Friedlander (2000) et issu de l'étude de Hirth et Pound (1963), donne quelques caractéristiques des conditions d'obtention de la nucléation homogène pour différentes espèces.

Vapeur	T (K)	Rapport de saturation critique S_{cr}	Diamètre critique du noyau stable (nm)	Nombre de molécules dans le noyau
Eau	275,2	4,2	1,78	80
Méthanol	270	1,8	1,58	32
Éthanol	273	2,3	2,84	128
<i>n</i> -Butanol	270	4,5	2,72	72
Acétate d'éthyle	242	10,4	2,28	40

Tableau 1.VIII. Conditions d'obtention de la nucléation homogène pour différentes espèces.

La nucléation hétérogène se produit à partir d'un système constitué de particules de diamètres inférieurs à 0,1 μm (noyaux de condensation) et de vapeur. Pour une faible sursaturation, et selon la nature du noyau, des molécules de la vapeur considérée peuvent s'adsorber sur le noyau. À partir de cette situation, si le noyau est d'une taille suffisante, on observe la condensation de la vapeur.

Pour une sursaturation donnée, il existe un diamètre critique des noyaux au-delà duquel se produit la condensation ; ce diamètre diminue lorsque la sursaturation augmente. Ce diamètre minimum pour obtenir la nucléation hétérogène ou la condensation est dû à l'effet Kelvin ; il décrit l'augmentation de la pression de vapeur saturante d'une espèce au voisinage d'une interface liquide-gaz présentant une forte courbure par rapport à une interface plane.

Dans le cas où le noyau de condensation (ayant un diamètre supérieur au diamètre critique de Kelvin) est électriquement chargé, la pression de vapeur saturante à sa surface est réduite et la condensation se produit pour une sursaturation plus faible que dans le cas d'un noyau neutre. Ces noyaux électriquement chargés sont assimilés à des ions, petits ou gros, suivant leur mobilité électrique (Bricard et Pradel, 1966 ; Renoux et Boulaud, 1998). Dans le cas de noyaux de condensation solubles, la présence d'un sel diminue la pression de vapeur saturante au-dessus de la surface. En conséquence, pour un rapport de saturation donnée, on observera la nucléation hétérogène pour des noyaux solubles plus petits que pour des noyaux insolubles.

Lorsqu'une gouttelette stable est formée (diamètre supérieur au diamètre critique de Kelvin), elle peut grossir par condensation. Sa vitesse de grossissement va dépendre du rapport de saturation, de la taille de la gouttelette et du nombre de Knudsen (régime continu ou moléculaire). Hinds (1999) décrit les différentes relations permettant de calculer le grossissement des gouttelettes par condensation et la diminution de leur diamètre par évaporation. Le tableau 1.IX présente quelques temps caractéristiques d'évaporation de gouttelettes pour différents liquides.

Diamètre initial de la gouttelette (μm)	Éthanol	Eau	DOP
0,01	4×10^{-7}	2×10^{-6}	1,8
0,1	9×10^{-6}	3×10^{-5}	740
1	3×10^{-4}	10^{-3}	3×10^4
10	0,03	0,08	2×10^6
40	0,4	1,3	4×10^7

Tableau 1.IX. Temps de vie d'une gouttelette exprimé en secondes (Hinds, 1999). Le phtalate de di-octyle (DOP) est un liquide huileux qui a été beaucoup utilisé pour la production d'aérosols liquides.

2.5. Dépôt des particules

2.5.1. Dépôt des particules dans les conduits

Lorsqu'un aérosol est transporté dans un conduit, les particules peuvent se déposer sur les parois en fonction de leur taille, selon les principaux mécanismes suivants : sédimentation, inertie, diffusion brownienne, effets électrostatiques, thermophorèse. Pour caractériser le dépôt des particules dans les conduits, on utilise généralement une vitesse de dépôt relevant d'un ou de plusieurs de ces mécanismes. Le régime d'écoulement, laminaire ou turbulent, a également une grande influence sur le dépôt.

Le dépôt par sédimentation concerne principalement les particules de diamètre aérodynamique supérieur à $1 \mu\text{m}$; il peut concerner des particules de diamètre inférieur, suivant la géométrie du conduit et le temps de passage dans le conduit.

Le dépôt par inertie intervient en régime laminaire ou turbulent lorsque l'écoulement passe dans un coude ou un rétrécissement. En écoulement turbulent, ce mécanisme existe quelle que soit la géométrie du conduit, du fait de l'inertie acquise par les particules dans les tourbillons.

Dans le cas des écoulements turbulents dans un conduit cylindrique, pour le dépôt par diffusion brownienne ou par inertie, on définit la fraction pénétrante à travers le conduit η en fonction de la vitesse de dépôt des particules en utilisant une fonction de la forme :

$$\eta = \frac{C_{\text{sortie}}}{C_{\text{entree}}} = \exp\left(-\frac{\pi \cdot d \cdot L \cdot V_d}{Q}\right), \quad (21)$$

où C représente la concentration en nombre des particules, d le diamètre interne du tube, L la longueur du tube, Q le débit volumique et V_d la vitesse de dépôt des particules par diffusion brownienne ou par diffusion turbulente inertielle.

Généralement, on utilise différentes formes semi-empiriques de cette fonction suivant le mécanisme de dépôt étudié. Pour cela, on utilise des nombres adimensionnels caractérisant le comportement du fluide et des particules, et des coefficients d'ajustement par rapport aux données expérimentales.

Dans le cas du dépôt des aérosols nanométriques, Malet (1997) et Brockmann (2001) présentent des synthèses des théories et de leur domaine de validité. Les résultats de Malet (1997) et Malet et coll. (2000) montrent la validité de certaines relations théoriques, notamment celle de Friedlander (1977) pour des particules d'environ 1 nm.

La figure 1.5 montre l'importance relative des différents mécanismes de dépôt dans un tube cylindrique horizontal de diamètre 1 cm et de longueur 10 m, pour une vitesse moyenne d'écoulement de $6,4 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui correspond à un débit de 30 l/min. Dans ces conditions, l'écoulement est turbulent (le nombre de Reynolds est égal à 4 200). Les particules sont supposées sphériques et de densité unité. Le dépôt par diffusion brownienne est calculé avec la relation de Friedlander (1977), le dépôt par inertie de diffusion turbulente est calculé avec la relation de Liu et Agarwal (1974) et le dépôt par sédimentation avec la relation de Schwendiman et coll. (1975) ; ces relations ont été synthétisées par Brockmann (2001).

La figure 1.5 montre qu'en deçà de $0,1 \mu\text{m}$, le mécanisme de dépôt prépondérant est la diffusion brownienne et que, au-delà de $2 \mu\text{m}$, c'est la diffusion turbulente et la sédimentation qui prédominent. Pour les particules de diamètres compris entre $0,1 \mu\text{m}$ et $1 \mu\text{m}$, le dépôt est faible, les fractions pénétrantes étant proches de 1.

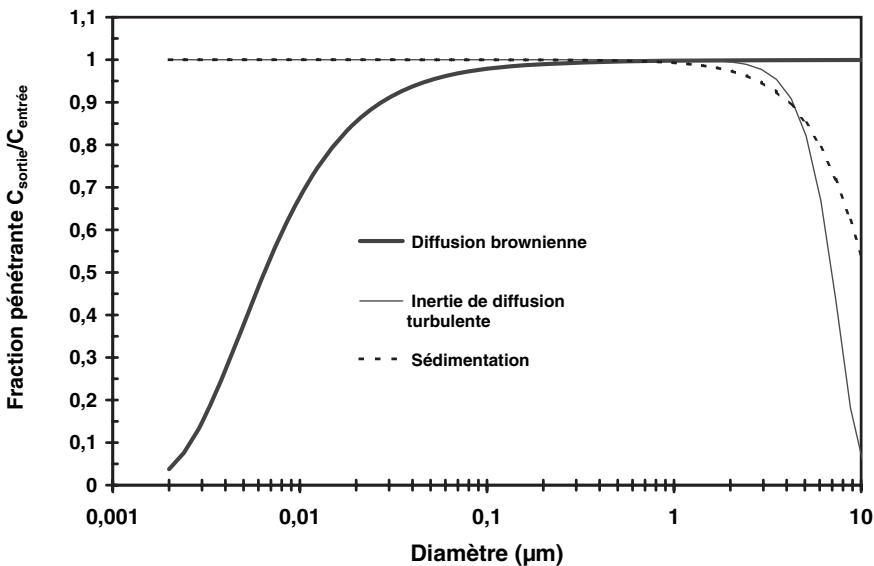


Figure 1.5. Exemple de calculs de fraction pénétrante dans un tube.

2.5.2. Dépôt des particules dans une enceinte ventilée

Pour étudier ou caractériser le dépôt des aérosols dans un local ou dans une enceinte de confinement ventilés, l'approche la plus courante, présentée schématiquement ci-après, repose sur la détermination du coefficient de dépôt des particules.

Dans une enceinte de volume V , ventilée avec un débit de gaz Q exempt de particules, on décrit l'évolution de la concentration d'un polluant particulaire initialement présent par la relation :

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{Q}{V} \cdot C - \beta \cdot C, \quad (22)$$

où $C(d_p, t)$ représente la concentration en nombre de particules de diamètre d_p à l'instant t ($\text{p}\cdot\text{m}^{-3}$) et $\beta(d_p)$ le coefficient de dépôt des particules sur les parois (s^{-1}).

Cette relation est valable si l'on suppose que la concentration des particules dans l'enceinte est homogène à chaque instant. Si l'on suppose qu'il n'y a pas de source de particules, et si l'on néglige les phénomènes de disparition des particules de diamètre d_p autres que celui du dépôt sur les parois, la solution de l'équation 22 est :

$$C(d_p, t) = C_0 \cdot \exp(-t/T(d_p)) \text{ avec } \frac{1}{T(d_p)} = \frac{Q}{V} + \beta(d_p), \quad (23)$$

où $T(d_p)$ représente la constante de temps d'épuration des particules de diamètre d_p .

Le coefficient de dépôt β permet de rendre compte du nombre de particules qui se dépose par unité de temps sur les surfaces S d'une enceinte de volume V ventilée par un débit Q pour une concentration de $1 \text{ particule}\cdot\text{m}^{-3}$. Une expression simple de β prend en compte le dépôt par sédimentation des grosses particules et le dépôt par diffusion brownienne des PUF ; elle est donnée par Corner et Pendlebury (1951) :

$$\beta = \frac{V_s}{h} + \frac{S \cdot D}{V \cdot \sigma}, \quad (24)$$

où V_s représente la vitesse de sédimentation des particules, h la hauteur de l'enceinte, S et V la surface totale et le volume de l'enceinte, et D ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) le coefficient de diffusion brownienne ; σ (m) est défini comme l'épaisseur d'une couche limite de diffusion sur les parois de l'enceinte.

Dans cette approche, on suppose qu'il existe un mélange parfait de l'aérosol en dehors de la couche limite et une absence de mélange dans la couche limite, où les particules se déplacent uniquement par diffusion brownienne. La figure 1.6 schématise la situation étudiée.

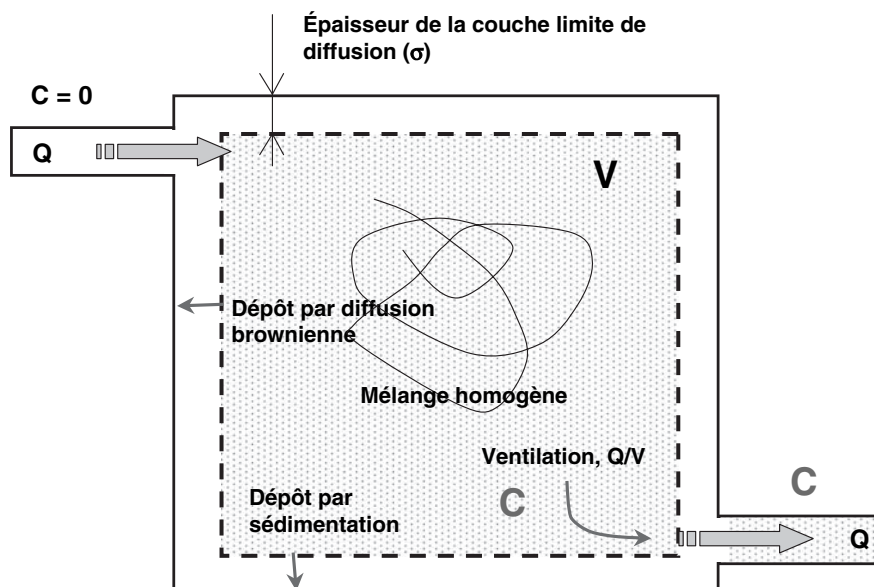


Figure 1.6. Schéma général de l'évolution d'un polluant dans une atmosphère homogène.

Généralement, il est nécessaire de considérer l'épaisseur de la couche limite σ comme une fonction de la taille des particules, des caractéristiques de l'enceinte et du degré de mélange, qui est en partie fonction du débit de ventilation (Crump et coll., 1983).

À titre d'exemple, la figure 1.7 représente le coefficient de dépôt calculé en fonction du diamètre des particules dans le cas d'une enceinte cubique de volume 1 m^3 . On considère les particules comme sphériques et de densité unité. L'épaisseur de la couche limite de diffusion est ici égale à $0,85 \text{ mm}$, indépendante du diamètre des particules ; cette valeur est issue d'une étude expérimentale réalisée par Van de Vate (1972). Pour comparaison, le coefficient de dépôt est également calculé pour une épaisseur de $50 \mu\text{m}$.

On peut constater sur cette figure que, pour des diamètres inférieurs à $0,1 \mu\text{m}$, le coefficient de dépôt augmente lorsque le diamètre des particules diminue ; ceci est principalement dû à l'augmentation du coefficient de diffusion brownienne des particules. Ce comportement a été validé expérimentalement jusqu'à un diamètre de particule égal à 15 nm (Nomura et coll. 1997). Lorsque le diamètre des particules augmente, la sédimentation devient le mécanisme prépondérant notamment au-delà de $1 \mu\text{m}$.

Il existe une valeur minimum du coefficient de dépôt pour des particules de diamètres compris entre $0,1 \mu\text{m}$ et $1 \mu\text{m}$. Dans cette gamme, il n'y a pas de mécanisme prépondérant sur le dépôt des particules : c'est le régime transitoire. La figure 1.7 montre que lorsque l'épaisseur de la couche limite diminue, le diamètre correspondant au minimum du coefficient de dépôt augmente, ce qui est dû au fait que des particules avec un faible coefficient de diffusion peuvent traverser l'épaisseur réduite de la couche limite.

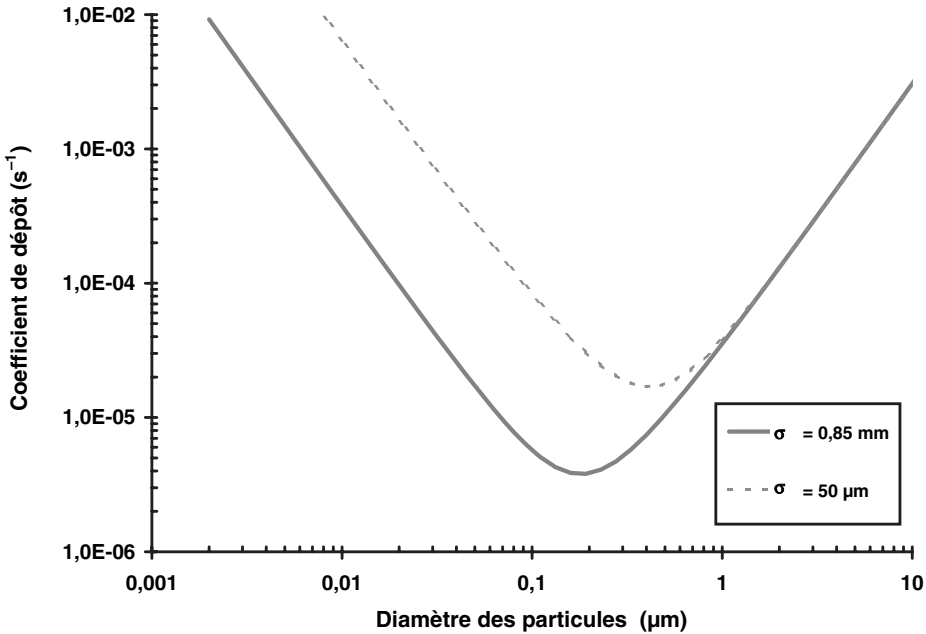


Figure 1.7. Exemple de calcul du coefficient de dépôt pour une enceinte cubique de 1 m^3 .

La relation 23, simple, ne permet pas de représenter les effets de tous les mécanismes de dépôt, notamment l'effet de la diffusion turbulente provoquée par le mélange du gaz dans l'enceinte. La diffusion turbulente engendre un dépôt du fait de l'inertie acquise par les particules portées dans les tourbillons du gaz. Cet effet doit être pris en compte pour des particules, notamment supérieures à $0,1 \mu m$ (Crump et Seinfeld, 1981). Plusieurs auteurs proposent des expressions du coefficient de dépôt qui tiennent compte de la diffusion turbulente (Crump et Seinfeld 1981 ; Crump et coll. 1983 ; Shimada et coll. 1989 ; Nomura et coll. 1997).

Conclusion

Les aérosols peuvent comporter des particules ayant des tailles réparties entre $0,1 \text{ nm}$ et $100 \mu m$; les mécanismes qui déterminent le comportement des particules sont différents suivant leur taille. À la pression atmosphérique, ce sont la sédimentation et les effets inertiels qui régissent le mouvement et le dépôt des particules de taille supérieure à $1 \mu m$. Dans le cas des particules de taille inférieure à $0,1 \mu m$, c'est le mouvement brownien dû aux chocs entre les particules et les molécules du gaz qui conditionne leur comportement local. De ce fait, les aérosols ultra-fins évoluent rapidement par coagulation, attachement sur l'aérosol atmosphérique et dépôt sur les surfaces. En conséquence, lorsqu'on s'éloigne d'une source ponctuelle de particules ultra-fines, la probabilité de

rencontrer des particules en suspension avec leurs caractéristiques d'origine (taille, concentration) diminue. Par exemple, un polluant porté par des particules ultra-fines va rapidement se fixer sur l'aérosol atmosphérique ; dès lors, ce polluant va suivre le comportement physique de l'aérosol atmosphérique.

Généralement, à l'échelle macroscopique, le transport des particules est dû à la diffusion turbulente et aux mouvements de convection, et non pas à la diffusion brownienne. En revanche, au voisinage d'une surface, c'est la diffusion brownienne qui conditionne le dépôt des aérosols ultra-fins.

Pour les particules électriquement chargées en présence d'un champ électrique, les forces électriques peuvent être non négligeables voire prédominantes. Suivant leur mécanisme de production, les particules peuvent être fortement chargées ; après mise à l'équilibre avec des ions bipolaires, la proportion de particules chargées dépend de leur diamètre. Dans ce cas, pour des particules de 10 nm, environ 10 % des particules portent une charge électrique positive ou négative.

Bibliographie

- Allen MD, Raabe OG (1982). Re-evaluation of Millikan's oil drop data for the motion of small particle in air. *J Aerosol Sci* **6**, 537-547.
- Allen MD, Raabe OG (1985). Slip correction measurement of spherical solid aerosol particles in an improved Millikan apparatus. *Aerosol Sci Technol* **4**, 269-286.
- Baron PA, Willeke (2001). Aerosol fundamental, In *Aerosol Measurement, Principles Techniques and Applications*. 2^e ed, Baron et Willeke, Wiley & Sons.
- Baron PA, Sorensen C, Brockmann JE (2001). Nonspherical particle measurement : shape factors, fractals and fibers. In *Aerosol Measurement, Principles Techniques and Applications*. 2nd ed, Baron et Willeke, Wiley & Sons.
- Bering EA, Few AA, Benbrook JR (1998). The global electric circuit. *Physics Today*. Oct 98, 24-30.
- Bricard J (1977a). Physique des aérosols 1^{re} partie. Rapport CEA-R-4831 (2).
- Bricard J (1977b). Physique des aérosols 2^e partie. Rapport CEA-R-4831 (2).
- Bricard J, Pradel J (1966). Electric charge and radioactivity of naturally occurring aerosols. In *Aerosol Science* edited by CN Davies, Academic Press.
- Brockmann JE (2001). Sampling and transport of aerosols. In *Aerosol Measurement, Principles Techniques and Applications*. 2nd ed, Baron et Willeke, Wiley & Sons.
- Chalmers J.A (1967). Atmospheric Electricity. 2nd Edition Pergamon Press.
- Cohen B S, Xiong J Q, Li W (1996). The influence of charge on the deposition behavior of aerosol particles with emphasis on single charged nanometer sized particles. In *Aerosol Inhalation : Recent Research Frontiers*. Ed by Marijnissen et Gradon, Kluwer academic publisher.
- Corner J, Pendlebury ED (1951). The coagulation and deposition on a stirred aerosol. *Proc Phys Soc* **364**, 645-654.
- Crump JG, Seinfeld JH (1981). Turbulent deposition and gravitational sedimentation of an aerosol in a vessel of arbitrary shape. *J. Aerosol Sci* **12**, 405-415.

- Crump JG, Flagan RC, Seinfeld JH (1983). Particle wall loss rates in vessels. *Aerosol Sci Technol* **2**, 303-309.
- Fews AP, Henshaw DL, Keitch PA, Close JJ, Wilding RJ (1999). Increased exposure to pollutant aerosols under high voltage power lines. *Int J Radiat. Biol* **75**, 1505-1521.
- Flagan RC (2001). Electrical techniques, In *Aerosol Measurement, Principles Techniques and Applications*. 2nd ed, Baron et Willeke, Wiley & Sons.
- Friedlander SK (1977). *Smoke, Dust and Haze*. 1st ed, Wiley, New York.
- Friedlander SK (2000). *Smoke, Dust and Haze. Fundamentals of Aerosol Dynamics*. 2nd ed, Oxford University Press.
- Fuchs NA (1963). On the stationnary charge distribution on aerosol particles in a bipolar ionic atmosphere. *Geophys Pura Appl* **56**, 185-193.
- Fuchs NA (1964). *The mechanics of Aerosols*. Ed. by Pergamond Press, Oxford.
- Hinds WC (1999). *Aerosol technology : properties, behavior, and measurement of airborne particles*. 2nd ed, Wiley & Sons.
- Hirth JP, Pound GM (1963). *Condensation and evaporation—nucleation and growth kinetics*. Pergamon Press, 190 pages.
- Hoppel WA, Frick GM (1986). Ion-Aerosol attachment coefficients and the steady-state charge distribution on aerosols in a bipolar ion environment. *Aerosol Sci Technol* **5**, 1-21.
- Keefe D, Nolan PJ, Rich TA (1959). Charge equilibrium in aerosols according to the Boltzmann law. *Proc. Royal Irish Acad* **60**, 27-45.
- Kim JH, Mulholland GW, Kukuck SR, Pui DHY (2005). Slip correction measurements of certified PSL nanoparticles using a Nanometer Differential Mobility Analyser (Nano-DMA). For Knudsen number from 0.5 to 83. *J Res Nat Instit Stand Technol* **110**, 31-54.
- Lissowski P (1940). Das Laden von Aerosolteilchen in einer bipolaren Ionenatmosphäre. *Acta Physicochimica U.R.S.S.* vol **XIII** n° **2**, 157-192.
- Liu BH, Agarwal JK (1974). Experimental observation of aerosol deposition in turbulent flow. *J Aerosol Sci* **5**, 589-600.
- Malet J (1997). Transport et dépôt des aérosols nanométriques - Application à la fraction libre des descendants à vie courte du Radon. Thèse de Doctorat. Université Paris XII. Rapport CEA-R-5776.
- Malet J, Alloul L, Michielsen N, Boulaud D, Renoux A (2000). Deposition of nanosized particles in cylindrical tubes under laminar and turbulent flow conditions. *J Aerosol Sci* **31**, 335-348.
- Melandri C, Tarroni G, Prodi V, De Zaiacomo T, Formignani M, Lombardi C C (1983). Deposition of charged particles in the human airways. *J Aerosol Sci* **14**, 657-669.
- Nomura Y, Hopke PK, Fitzgerald B, Mesbah B (1997). Deposition of particles in a chamber as a function of ventilation rate. *Aerosol Sci Technol* **27**, 62-72.
- Park SH, Kruis FE, Fissan H (2002). Evolution of particle size distributions due to turbulent and brownian coagulation. *Aerosol Sci Technol* **36**, 419-432.
- Park SH, Lee KW, Otto E, Fissan H (1999). The log-normal size distribution theory of Brownian coagulation for the entire particle size range: part 1 – analytical solution using the harmonic mean coagulation kernel. *J Aerosol Sci* **30**, 3-16.
- Rader DJ (1990). Momentum slip correction factor for small particles in nine common gases. *J Aerosol Sci* **21**, 161-168.

- Ramamurthi M, Strydom R, Hopke PK (1990). Assesment of wire and tube penetration theories using a $^{218}\text{PoOx}$ cluster aerosol. *J Aerosol Sci* **21**, 189-192.
- Reischl GP, Mäkelä JM, Karch R, Necid J (1996). Bipolar charging of ultrafine particles in the size range below 10 nm. *J Aerosol Sci* **27**, 931-949.
- Renoux A, Boulaud D (1998). *Les aérosols : Physique et Métrologie*. Ed. Lavoisier, Technique & documentation.
- Renoux A, Boulaud D (2003a). Physique des aérosols, partie 1. Techniques de l'ingénieur, traité sciences fondamentales. **AF 3 612**.
- Renoux A, Boulaud D (2003b). Physique des aérosols, partie 2. Techniques de l'ingénieur, traité sciences fondamentales. **AF 3 613**.
- Schwendiman LC, Stegen GE, Glissmeyer JA (1975). Methods and aids for assessing particle losses in sampling lines. Report BNWL-SA-5138. Richland, WA Battelle Pacific Northwest Laboratory.
- Shimada M, Okuyama K, Kousaka Y (1989). Influence of particle inertia on aerosol deposition in a stirred turbulent flow flied. *J. Aerosol Sci* **20**, 419-429.
- Van de Vate JF (1972). The thickness of the stagnant air layer in aerosol containments and the aerodynamic diameter of aggregate of small spheres. *J. Colloid Interf Sci* **41**, 194-197.
- Wiedensohler A (1988). An approximation of the bipolar charge distribution for particles in the submicron size range. *J Aerosol Sci* **19**, 387-389.
- Williams MMR, Loyalka SK (1991). Aerosol science theory and practice with special applications to the nuclear industry. Ed. Pergamon Press.

3. Filtration des aérosols

D. Thomas, D. Bémer

Introduction

De nombreux procédés industriels nécessitent un air peu ou très peu chargé en particules ; pour certains, une qualité d'air exceptionnelle est même requise. Le contrôle des expositions aux aérosols est également un impératif pour les personnes travaillant dans l'industrie, le secteur tertiaire et l'agriculture, compte tenu des propriétés toxiques de certaines particules. La filtration de l'air s'impose par conséquent à différents niveaux et, pour cela, de nombreux systèmes existent. La filtration au moyen de médias fibreux reste la technique la plus répandue en raison de ses performances, de son faible coût et de sa grande adaptabilité.

Un filtre à fibres (figure 1.8) est constitué de fibres métalliques, naturelles ou synthétiques (Purchass, 1997). Pour leur conférer des propriétés intéressantes, ces médias filtrants peuvent subir un traitement thermique ou mécanique. Un filtre est défini par sa compacité (volume des fibres/volume du filtre), son grammage (masse du filtre/surface du filtre), son épaisseur, et la distribution granulométrique ou le diamètre moyen des fibres.

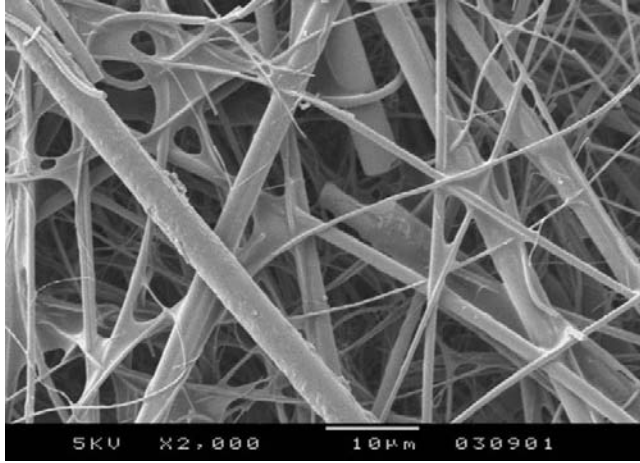


Figure 1.8. Photographie au microscope électronique à balayage d'un filtre à fibres de verre.

3.1. Efficacité d'un filtre et de ses facteurs

À l'état neuf, un filtre à fibres est caractérisé par sa perte de charge (différence de pression entre l'amont et l'aval du filtre) et par son efficacité E , dite initiale, définie par le rapport de la différence entre concentrations amont et aval à la concentration amont. Pour des filtres très efficaces, on préfère le terme de pénétration (P), rapport de la concentration aval à la concentration amont. Les deux termes sont liés par $E = 1 - P$. Un « bon filtre » doit présenter une perte de charge (ΔP) faible afin de minimiser la dépense énergétique, et une efficacité élevée. Liu (1990) a proposé un critère, appelé facteur de qualité ($-\ln(1 - E)/\Delta P$), pour comparer les filtres. Ainsi, un « bon filtre » doit présenter un facteur de qualité élevé. Ce critère est néanmoins à prendre avec précaution, car plusieurs couples de valeurs d'efficacité et de perte de charge peuvent conduire au même facteur de qualité. Il est dans ce cas difficile de choisir un filtre sur la seule valeur de ce critère.

L'efficacité initiale est déterminée expérimentalement. Cependant, il est possible, sous certaines conditions, de l'évaluer. Ainsi, pour un filtre homogène dans sa structure et sa composition, l'efficacité d'un filtre à fibres est donnée par :

$$E = 1 - \exp\left(-4\eta \frac{\alpha}{1 - \alpha\pi d_f} Z\right)$$

avec :

α : efficacité unitaire de collection d'une fibre

η : compacité du filtre

Z : épaisseur du filtre

d_f : diamètre des fibres (supposées toutes du même diamètre)

L'efficacité unitaire de collection d'une fibre est la probabilité de capture d'une particule de taille donnée par une fibre. Une erreur très répandue consiste à supposer que seul un effet tamis est responsable de la capture des aérosols par un milieu fibreux. En réalité, l'efficacité unitaire de collection d'une fibre est fonction de plusieurs mécanismes physiques (Baron et Willeke, 2001 ; Renoux, 1998). En l'absence de tout champ de force extérieure autre que le champ de gravité, les plus importants de ces mécanismes sont énumérés ci-après.

La diffusion brownienne

Ce type de capture est significatif pour des particules de faible taille ($d_p < 0,1 \mu\text{m}$). Sous l'effet de l'agitation brownienne, elles peuvent entrer en contact avec les fibres et y adhérer (figure 1.9).

L'interception directe

Ce mécanisme de capture concerne les particules de taille supérieure à $0,1 \mu\text{m}$. Une particule de diamètre d_p suivant une ligne de courant est interceptée par une fibre lorsqu'elle s'approche de celle-ci à une distance inférieure à son rayon (figure 1.10, partie inférieure).

L'impaction inertielle

Ce type de capture est prépondérant pour les grosses particules ($d_p > 1 \mu\text{m}$). En raison de son inertie, une particule ne suit pas la ligne de courant contournant la fibre, mais va en impacter la surface (figure 1.10, partie supérieure).

L'effet électrostatique

Entre une particule et une fibre, à condition que l'une et/ou l'autre soient chargées, il existe une force attractive. Cette force est nommée :

- force coulombienne entre une particule et une fibre chargées ;
- force de polarisation entre une particule électriquement neutre et une fibre chargée (Brown, 1993 ; figure 1.11, partie supérieure) ;
- force image entre une particule chargée et une fibre neutre (voir point 2.2.3, plus haut ; Brown, 1993 ; figure 1.11, partie inférieure). Selon Walsh (1996), l'efficacité unitaire de collection est dans ce dernier cas négligeable par rapport aux deux mécanismes précédents.

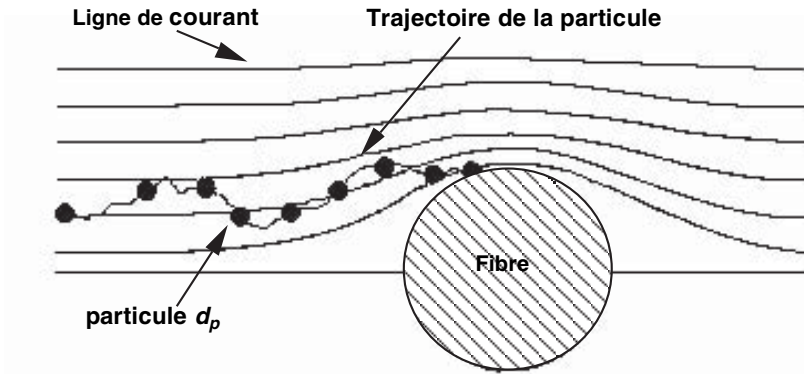


Figure 1.9. Collection des particules par diffusion.

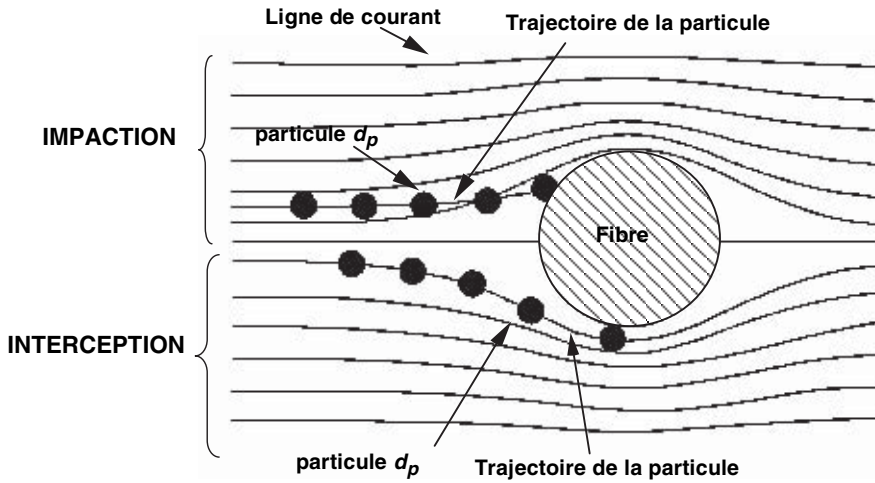


Figure 1.10. Collection des particules par impaction et interception.

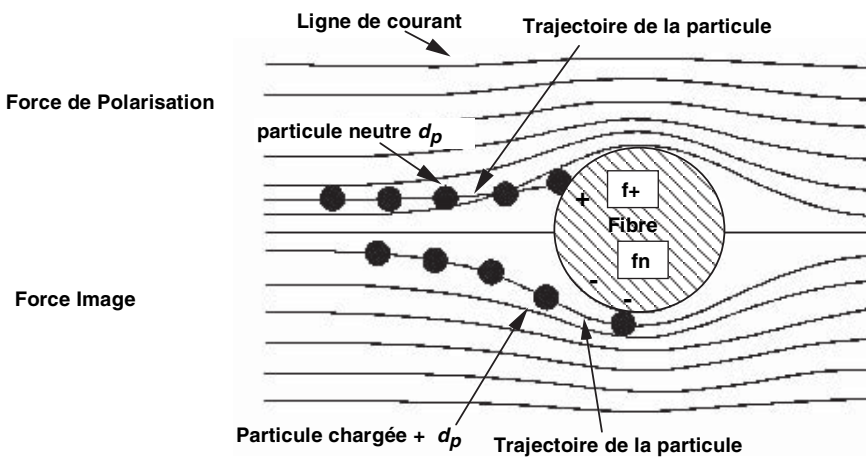


Figure 1.11. Collecte des particules par polarisation.

Ces forces électrostatiques peuvent jouer un rôle en filtration en modifiant les trajectoires des particules, en altérant les phénomènes d'adhérence et de rebond, ou en agissant sur le colmatage. Le résultat de l'action des forces électrostatiques fait qu'une particule passant au voisinage de la fibre est déviée et peut être collectée.

Le rendement de capture est augmenté lorsque les charges portées sont fortes et les vitesses du gaz faibles. Les filtres de type « électrets » exploitent cette propriété en permettant d'obtenir des efficacités élevées avec une perte de charge faible (facteur de qualité élevé).

L'efficacité totale de collection est la résultante des trois mécanismes essentiels de capture des particules (inertie, interception, diffusion). On recense dans la littérature de nombreuses expressions tant empiriques que théoriques des efficacités unitaires de collection d'une fibre (Thomas, 2001a). Diverses corrélations entre l'efficacité totale et les efficacités unitaires tenant compte de la compétition entre les trois modes de capture ont été proposées par de nombreux auteurs. Aucune de ces relations ne donne un bon accord avec l'ensemble des efficacités déterminées expérimentalement. L'explication est à rechercher dans le fait qu'elles sont toutes fondées sur des modèles d'écoulement autour d'un arrangement idéalisé de fibres qui est loin de traduire la réalité. À l'heure actuelle, ces modèles nécessitent une confrontation et un ajustement avec l'expérience afin de tenir compte de la complexité structurelle du filtre et des caractéristiques de l'aérosol. Ils permettent cependant de dégager des tendances (tableau 1.X) sur l'influence relative des caractéristiques du média filtrant (diamètre moyen des fibres d_f , compacité du filtre α et épaisseur du filtre Z), de l'aérosol (masse volumique ρ_p et diamètre d_p des particules), des conditions opératoires (vitesse de filtration U_f) sur l'efficacité liée aux principaux mécanismes de collection.

Efficacité de collection par	Aérosol		Conditions opératoires	Caractéristiques du filtre		
	$\rho_p \nearrow$	$d_p \nearrow$		$d_f \nearrow$	$\alpha \nearrow$	$Z \nearrow$
- diffusion brownienne	$\searrow$	$\searrow$	$\searrow$	$\searrow$	$\nearrow$	$\nearrow$
- interception directe	-	$\nearrow$	-	$\searrow$	$\nearrow$	$\nearrow$
- impaction inertielle	$\nearrow$	$\nearrow$	$\nearrow$	$\searrow$	$\nearrow$	$\nearrow$

Tableau 1.X. Influence de divers paramètres intrinsèques à l'aérosol, au filtre et à la filtration sur l'efficacité totale d'un filtre à fibres pour les principaux mécanismes de collection.

La figure 1.12 illustre l'influence de la taille des particules sur les trois mécanismes décrits précédemment et sur l'efficacité initiale du filtre.

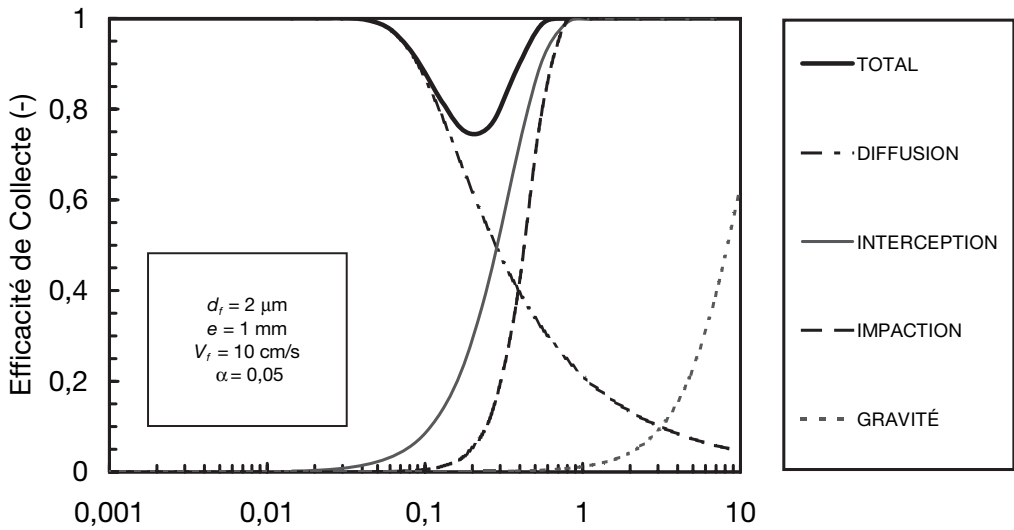


Figure 1.12. Variation de l'efficacité de collecte individuelle et totale en fonction du diamètre des particules. Calcul effectué selon le modèle de Hinds (1999) pour un filtre à fibres (diamètre de fibres $d_f = 2 \mu\text{m}$, épaisseur $Z = 1 \text{ mm}$, vitesse de filtration $V_f = 10 \text{ cm/s}$ et compacité $\alpha = 0,05$). D'après Witschger (2005).

Pour des tailles de particules comprises entre $0,1$ et $0,5 \mu\text{m}$, l'efficacité est minimale et peut varier, selon les caractéristiques des filtres, entre 0 et $99,99 \%$. Ce domaine correspond à des particules trop grosses pour que l'effet de diffusion soit efficace et trop petites pour que les mécanismes d'interception et d'impaction jouent un rôle important. Cette taille de particule est dite la plus pénétrante, en anglais *Most Penetrating Particle Size* (MPPS). Il s'agit donc des particules les plus difficiles à capter. C'est dans ce domaine de dimension particulière qu'est déterminée l'efficacité des filtres à air à très haute efficacité (HEPA) et à très faible pénétration (ULPA), mesurée d'après la méthode normalisée EN 1822-5 (2000). Le tableau 1.XI donne un exemple de classification de ces filtres. Pour les filtres de ventilation générale de moyenne à haute efficacité, une autre méthode d'essai fait référence, il s'agit de la norme EN 779 (2002). En ce qui concerne les appareils de protection respiratoire, les filtres à particules sont classés selon leur efficacité en trois classes P1, P2 et P3, selon une méthode décrite dans la norme EN 143.

Cas des filtres chargés électriquement

La capture d'une particule électriquement neutre par une fibre chargée présente la propriété remarquable de déplacer le minimum d'efficacité vers les plus petits diamètres, soit une MPPS comprise entre 50 et 60 nm au lieu de 200 à 300 nm dans le cas de la capture d'une particule neutre par une fibre neutre (figure 1.13). Ce phénomène de

glissement de la MPPS aura pour conséquence une surestimation de l'efficacité minimum attendue au diamètre de 0,6 µm par exemple (méthode de test à l'aérosol de chlorure de sodium – norme EN 143).

Classe de filtre	Valeur intégrale		Valeur locale	
	Efficacité (%)	Pénétration (%)	Efficacité (%)	Pénétration (%)
H10	85	15	/	/
H11	95	5	/	/
H12	99,5	0,5	97,5	2,5
H13	99,95	0,05	99,75	0,25
H14	99,995	0,005	99,975	0,025
U15	99,9995	0,0005	99,9975	0,0025
U16	99,99995	0,00005	99,99975	0,00025
U17	99,999995	0,000005	99,9999	0,0001

Tableau 1.XI. Classification des filtres HEPA (H10 - H14) et ULPA (U15 - U17) selon EN 1822-5. La valeur locale désigne l'efficacité locale minimale tolérée à l'examen des fuites.

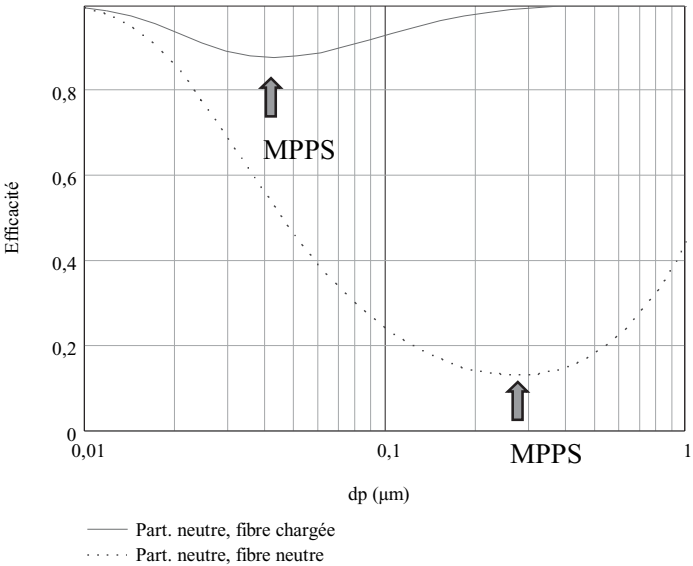


Figure 1.13. Variation de l'efficacité en fonction du diamètre de particule. Effet de la charge portée par les fibres sur la capture des particules avec mise en évidence d'un déplacement de la MPPS pour les fibres chargées.

De même, il existe une vitesse du gaz pour laquelle l'efficacité est minimale. Cette vitesse est de l'ordre de 20 à 40 cm·s⁻¹.

En dehors de ces paramètres (vitesse du gaz, taille des particules, diamètres des fibres, densité des fibres), l'efficacité spectrale ou fractionnelle (c'est-à-dire exprimée pour une taille de particule donnée) dépend :

- des propriétés d'adhésion fibre-particule ;
- de la température et de la pression du gaz traité ;
- de l'état de colmatage de la couche filtrante.

Il ressort du tableau 1.X qu'un accroissement de l'épaisseur, de la compacité du filtre ou une diminution du diamètre des fibres impliquent une augmentation de l'efficacité, au détriment toutefois d'une perte de charge plus élevée.

Pour les filtres utilisés en ventilation générale et les préfiltres (Guichard, non daté), l'accroissement de la vitesse entraîne généralement une augmentation du rendement pour les particules supérieures à quelques micromètres. Vers les tailles supérieures à 10 µm, il arrive que le rendement, après avoir augmenté, baisse à partir d'une certaine vitesse. Ce phénomène est attribué, la plupart du temps, à une trop grande énergie cinétique des particules, qui rebondissent sur les fibres. Il se peut également, surtout lorsque le filtre est colmaté, que des particules migrent à travers la couche poreuse (par augmentation de la vitesse locale, collision d'une particule avec le dépôt, vibrations mécaniques du filtre...) et finissent par être ré-entraînées lorsqu'elles arrivent à la face de sortie.

L'allure de la courbe (figure 1.13) a été vérifiée expérimentalement pour des aérosols supérieurs à 0,05 µm. Des questions demeurent sur l'efficacité d'un filtre à fibres dans le domaine des particules nanométriques de tailles inférieures à 30 nm environ, domaine correspondant à la transition aérosol – gaz (particule – molécule ; voir le point 2.1). Les études menées sur la filtration de nanoparticules sont en très petit nombre et parfois contradictoires.

Ainsi, une étude théorique menée par Wang et Kasper (1991), tenant compte du rebond thermique des particules en plus des mécanismes liés à l'interception et à la diffusion, montre que, pour des particules inférieures à 10 nm, l'efficacité du filtre à fibres diminue. Wang (1996) valide cette théorie en s'appuyant sur des résultats obtenus par Ichitsubo et coll. (1996). Cette évolution a été confirmée expérimentalement par Balazy et coll. (2004) sur des filtres à fibres de classes G4 et F5 avec des gouttelettes de DEHS (Di-2-EthylHexyl Sebacate, sébacate de di-éthyle hexyle). Ces auteurs ont mis en évidence une baisse de l'efficacité de collection à partir de 20 nm.

Skaptsov et coll. (1996) ont étudié expérimentalement la filtration de nanoparticules d'oxyde de tungstène et d'oxyde de molybdène de diamètres compris entre 3,1 et 15,4 nm à travers une batterie de diffusion constituée de huit tamis en fils d'acier. Leurs

résultats montrent une augmentation de l'efficacité lorsque la taille des particules diminue ; il en est de même lorsque la température diminue.

Une étude (anonyme, 1995) a été réalisée par trois organismes (AUVA : Allgemeine Unfallversicherungsanstalt ; TBG : Tiefbau-Berufsgenossenschaft et CNA : Caisse nationale suisse d'assurance en cas d'accidents) sur la filtration des gaz de combustion émis par les moteurs diesels. Ces organismes ont notamment étudié quatre filtres :

- filtre cellulaire en céramique ;
- filtre métallique fritté à structure cellulaire ;
- filtre bobiné en fibres ;
- filtre tissé en fibres.

Ils ont mis en évidence que la plupart des filtres présentent une dégradation du rendement de collection pour des particules inférieures à 30-40 nm (diamètre de mobilité électrique). Pour deux des filtres testés, ce phénomène se manifeste déjà pour des particules d'environ 70 nm.

Malet (1997) a pu vérifier expérimentalement, dans son travail sur le transport et le dépôt d'aérosols nanométriques, que les descendants à courte vie du radon de taille nanométrique étaient collectés par des filtres à fibres de très haute efficacité (caractéristiques non précisées) et par des membranes (Millipore AW19) avec une très bonne efficacité.

Alonso et Alguacil (1999) se sont intéressés à la filtration de nanoparticules de NaCl chargées positivement à travers des écrans constitués par des fibres d'acier ou de PET (polyéthylène téréphthalate). Ils ont mis en évidence une augmentation de l'efficacité de capture avec la diminution de la taille des particules.

Une étude plus récente menée par Heim et coll. (2005) remet en cause la théorie des rebonds thermiques et impute la baisse d'efficacité observée à des artefacts de mesure liés aux appareils ou à l'échantillonnage. Les mesures effectuées dans des conditions rigoureuses ont pu montrer l'absence de baisse d'efficacité pour des particules de NaCl > 2,5 nm sur divers média (grillage acier inoxydable ou nickel, filtre à fibres de polypropylène).

L'efficacité tendrait (tableau 1.XII) généralement à augmenter avec la diminution du diamètre de particules. Néanmoins, compte tenu du faible nombre d'études, il semble prématuré d'apporter une réponse précise sur la filtration de nanoparticules. Ceci est lié aux difficultés expérimentales de générer et de mesurer des nanoparticules. Il est probable que, pour ce type de particules, les interactions de surface entre particule et fibre, ou entre particules, jouent un rôle bien plus important que pour des particules de tailles supérieures. Le choix de la nature du média filtrant sera donc un élément primordial pour un aérosol donné.

Filtre		Aérosol		Efficacité lorsque la taille diminue	Référence
Type	Nature	Nature	Taille (nm)		
Filtre à fibres	Non précisée	DEHS	10 à 500	Augmente jusqu'à $d = 20$ nm, puis diminue	Balazy et coll. (2004)
Filtre à particules	- Cellulaire en céramique - Métallique fritté à structure cellulaire - Bobiné en fibres - Tissé en fibres	Particules de suie	30 à 200	Diminue en dessous de 30- 40 nm, ou 70 nm pour certains filtres	Anonyme (1995)
Batterie de diffusion	Acier inoxydable	Oxyde de molybdène	De 3,1 à 15,4	Augmente	Skaptsov et coll. (1996)
Batterie de diffusion	Acier inoxydable	Oxyde de tungstène	De 3,1 à 15,4	Augmente	Skaptsov et coll. (1996)
Grille		Benzène Argent NaCl Acétone 2-Butanone	1 à 5	Augmente jusqu'à 2 nm	Ichitsubo et coll. (1996), cité par Wang (1996)
Grille	Acier inoxydable. Diamètre des fibres 71 μm Épaisseur 151 μm Compacité 0,28	NaCl (particules chargées +)	5 - 100	Augmente	Alonso et Alguacil (1999)
Écran de fibres	PET, diamètre des fibres 70 μm ; épaisseur 161 μm Compacité 0,24	NaCl (particules chargées +)	5 - 100	Augmente	Alonso et Alguacil (1999)
Grilles et filtres à fibres	Acier inoxydable $d_f = 4,2 \pm 0,5$ μm Nickel, $d_f = 54,6$ $\pm 0,9$ μm Polypropylène, $d_f = 110$ μm	NaCl, particules chargées et non chargées	2,5 à 20	Augmente	Heim et coll. (2005)

Tableau 1.XII. Tableau de synthèse.

3.2. Évolution des performances du filtre au cours du colmatage

Au cours de la filtration, la capture de particules par le filtre induit une modification temporelle de sa structure qui se répercute sur sa perte de charge et sur son efficacité de collection. Le comportement du filtre diffère selon la nature de l'aérosol (solide ou liquide).

Dans le cas d'un *aérosol solide*, le colmatage induit une augmentation de la perte de charge et de l'efficacité au cours du temps (figure 1.14). Cette évolution temporelle se caractérise par trois phases distinctes, pour des filtres plans (Japuntich, 1994 ; Pénicot-Baugé, 1998) :

- la filtration en profondeur, correspondant à une lente évolution de la perte de charge en raison de la faible modification structurale du filtre ;
- la zone de transition, caractérisée par une évolution exponentielle de la perte de charge, coïncidant avec la formation d'un dépôt à la surface du filtre ;
- la filtration en surface, se traduisant par une évolution linéaire de la perte de charge. Le dépôt formé est suffisamment important pour capter les particules et jouer ainsi le rôle de filtre (autofiltration).

La perméance du filtre décroît de manière exponentielle en fonction du temps de filtration, avec une décroissance très prononcée lors des deux premières phases.

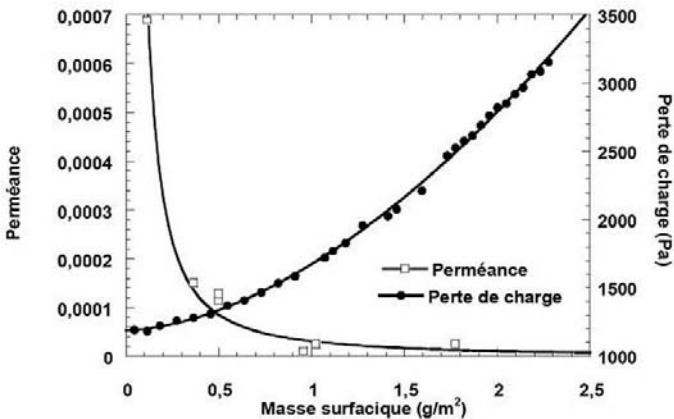


Figure 1.14. Exemple de l'évolution de la perméance et de la perte de charge d'un filtre HEPA en fonction de la masse surfacique des particules collectées ($dp = 0,18 \mu\text{m}$).

Dans le domaine de la ventilation des locaux, les filtres sont généralement plissés. L'utilisation d'un aérosol coloré a permis à Del Fabro (2002) de mettre en évidence un

colmatage non uniforme du filtre, lié à l'écoulement. Elle a observé une quatrième phase dans l'évolution de la perte de charge, attribuée à une réduction de la surface de filtration.

À l'heure actuelle, il est difficile de prévoir le comportement d'un filtre à fibres au cours du colmatage. Des modèles prédictifs de perte de charge et d'efficacité existent (Letourneau et coll., 1998 ; Thomas et coll., 2001b), mais leur domaine d'application reste actuellement limité aux filtres plans et aux particules submicroniques.

Par ailleurs, pour une même masse de particules collectées, la perte de charge du filtre sera plus importante pour des particules submicroniques. Dans ce cas, les particules collectées forment des dendrites, offrant une surface à l'écoulement plus importante (figure 1.15). Le dépôt de particules microniques se présente sous forme d'agrégats (figure 1.16).

Dans le cas de filtres dont les fibres sont chargées électriquement (filtres « électrets »), l'évolution de l'efficacité avec le colmatage est complexe ; elle présente généralement une phase de décroissance ou de stabilisation de l'efficacité en début de colmatage à la différence des filtres sans effet électrostatique. Cet effet est attribué à la perte progressive des

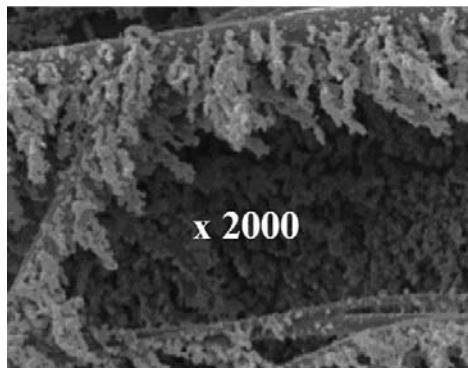


Figure 1.15. Dendrites constituées de particules de 0,15 μm de diamètre.

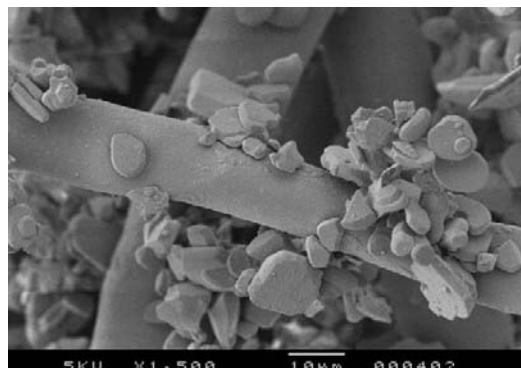


Figure 1.16. Agrégats sur fibres de particules d'alumine de diamètre moyen 2,6 μm .

charges électriques portées par les fibres au cours de la filtration. Il y a par conséquent, pour ces filtres, une compétition entre les deux mécanismes que sont le colmatage (augmentation de l'efficacité) et la disparition des charges (diminution de l'efficacité).

Dans le cas de la filtration d'un *aérosol liquide* sur filtre plan HEPA (Frising, 2004), les courbes de pertes de charge et de perméance ont des allures complètement différentes de celles obtenues pour la filtration d'aérosols solides (figure 1.17). On constate une diminution de l'efficacité au cours du colmatage (augmentation de la perméance) jusqu'à un seuil où la perte de charge et l'efficacité restent constantes.

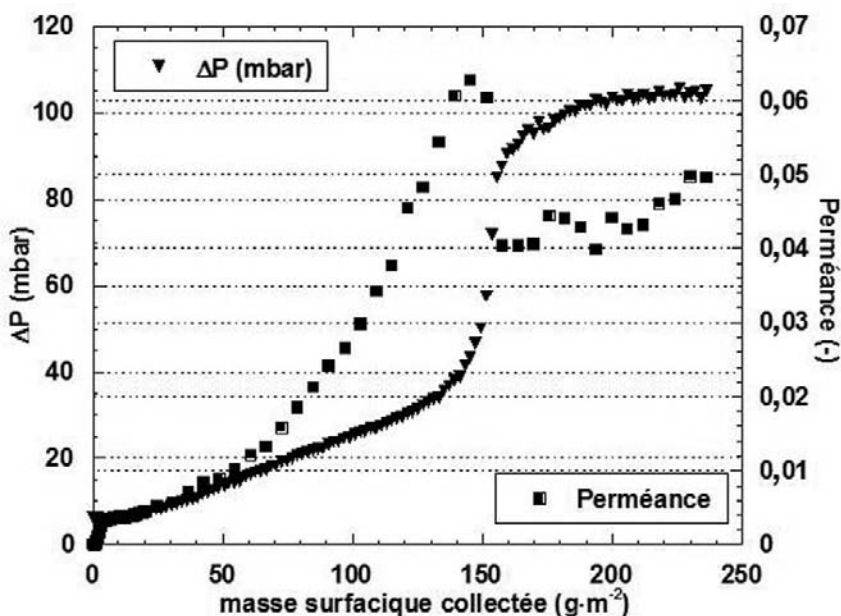


Figure 1.17. Évolution de la perte de charge et de la perméance d'un filtre THE pendant le colmatage par un aérosol de DEHS.

3.3. Équipements de protection respiratoire

Les demi-masques respiratoires jetables ou réutilisables sont très largement utilisés pour la protection vis-à-vis des aérosols liquides et solides (poussières, fumées et brouillards). La pénétration de l'aérosol à l'intérieur de l'appareil de protection respiratoire (APR) peut suivre deux voies : pénétration au travers du média et fuites aux joints d'étanchéité du visage. La première, qui dépend de la nature du média, de l'aérosol et des conditions de filtration, est décrite au chapitre précédent. La seconde, correspondant à la pénétration des aérosols au travers de fuites, a été largement étudiée (Vaughan et Tierney, 1994 ; Hinds et Kraske, 1987 ; Clement, 1995 ; Weber et Willeke, 1993). Les figures 1.18 et 1.19 illustrent l'influence d'une fuite calibrée sur l'efficacité de protection d'un APR.

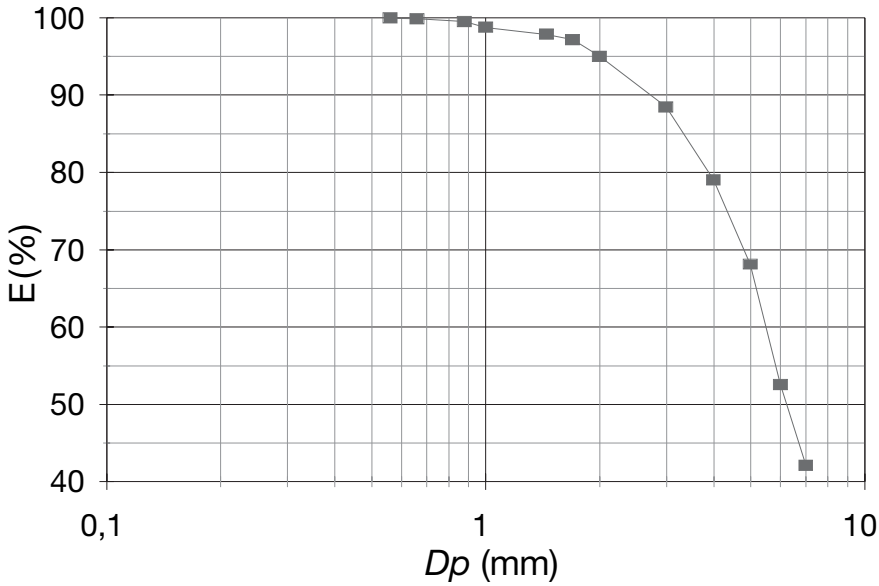


Figure 1.18. Variation de l'efficacité (E) d'un demi-masque (type non précisé) pour des particules monodispersées sphériques (de diamètre $d_p = 1,5 \mu\text{m}$) en fonction du diamètre d'une fuite calibrée (diamètre de pore D_p , en millimètres), constituée d'un tube de 15 mm de long placé en position centrale sur le masque. Perte de charge 50 Pa, débit $30 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$. (Extrait de Vaughan et Tierney, 1994.)

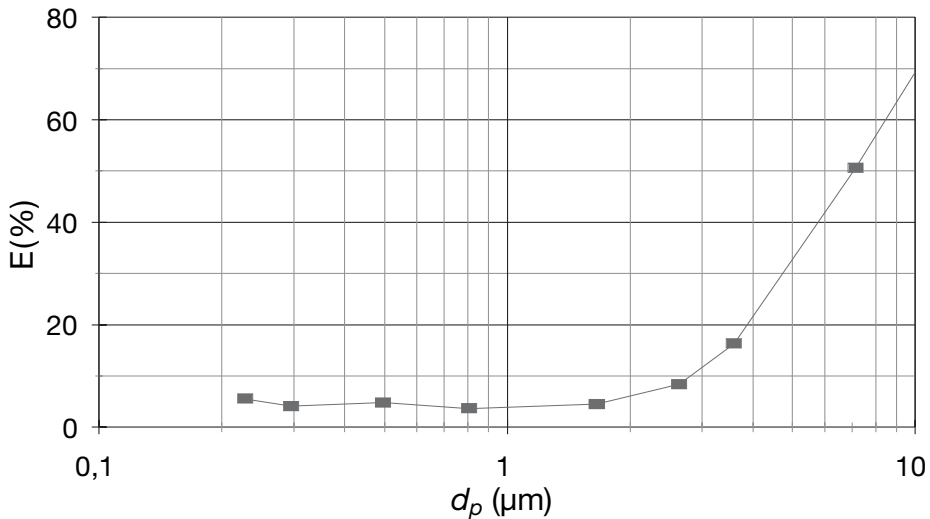


Figure 1.19. Variation de l'efficacité de protection (E) d'un demi-masque de type P3 (selon la norme EN 149 - 2001) en fonction du diamètre de particule (d_p), pour une fuite calibrée (de diamètre de pore $D_p = 0,5 \text{ mm}$) placée au niveau du joint d'étanchéité au visage - Perte de charge 52 Pa, débit $50 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$. (Extrait de Hinds et Kraske, 1987.)

Ces résultats mettent bien en évidence l'impact d'une fuite sur l'efficacité de protection, mais divergent sur le seuil au-delà duquel l'efficacité est fortement affectée. Par exemple, la figure 1.18 ne montre une dégradation significative de l'efficacité à $1,5\ \mu\text{m}$ qu'aux diamètres de pore supérieurs à $1\ \text{mm}$. En revanche, la figure 1.19 montre une efficacité très faible pour un diamètre de pore D_p de $0,5\ \text{mm}$, proche de $5\ \%$ pour un diamètre de particule d_p de $1,5\ \mu\text{m}$ ¹.

La figure 1.19 illustre le phénomène important, établi par de nombreux auteurs, de l'effet de la taille des particules sur la pénétration de l'aérosol. En effet, à la différence des gaz, la pénétration d'un aerosol au travers d'une fuite diminue lorsque la taille de la particule augmente au-delà de $1\ \mu\text{m}$ environ, du fait de l'action des mécanismes de dépôts par inertie sur les parois de l'orifice. Ce mécanisme est d'ailleurs à l'origine du comblement progressif des micro-fuites (diamètre de pore D_p de quelques dizaines de μm , Morton et Mitchell, 1995).

Aucune étude de pénétration de particules ultra-fines au travers des fuites n'a été identifiée. Il est vraisemblable qu'elle ne devrait pas différer beaucoup de celle d'un gaz, voire un peu inférieure compte tenu de la grande mobilité dynamique de ces particules. Ce mécanisme de dépôt par diffusion brownienne est à l'origine d'une diminution de la pénétration dans le domaine submicronique. Ces deux mécanismes (diffusion – $d_p < 0,1\ \mu\text{m}$ et inertie – $d_p > 1\ \mu\text{m}$) devraient par conséquent trouver leur minimum d'action entre $0,1$ et $1\ \mu\text{m}$. La norme NF EN 13274-1 permet de déterminer la fuite d'un appareil de protection respiratoire vis-à-vis d'un gaz (P_{gaz}) et d'un aerosol ($P_{\text{part.}}$) de diamètre médian aérodynamique en masse $0,6\ \mu\text{m}$, proche du maximum de pénétration théorique. En définitive, la pénétration des nanoparticules devrait être inférieure à la pénétration à $0,6\ \mu\text{m}$ déterminée selon la norme : $P_{\text{nanop}} < P_{0,6\ \mu\text{m}}$. Aucune confirmation expérimentale n'est encore venue valider cette affirmation. En l'absence de connaissances précises quant à la toxicité des particules ultra-fines, l'équipement de protection respiratoire recommandé est l'appareil filtrant à ventilation assistée avec masque complet, disposant d'un filtre de type P3 selon la norme NF EN 12942.

Conclusion

La filtration est le résultat d'interactions complexes entre un aerosol et les fibres. La physique de ces interactions dépend de nombreux paramètres comme la nature de l'aerosol (taille des particules, concentration, charges électriques, etc.), du média (distribution de tailles des fibres, charges électrostatiques, propriétés d'adhérence) et des caractéristiques thermodynamiques de l'air. Cette complexité est encore accrue du fait

¹. L'attention du lecteur est attirée sur le risque de confusion de certains symboles, notamment entre d_p , diamètre d'une particule, et D_p diamètre de pore d'un filtre.

des performances évolutives du média au cours du processus de filtration : colmatage et régénérations possibles (décolmatage).

En ce qui concerne la filtration des particules ultra-fines, la théorie et l'expérience s'accordent pour décrire un accroissement de l'efficacité lorsque le diamètre des particules diminue, jusqu'à une limite de 5 nm environ. En deçà, les performances sont mal établies et les études controversées. Les conclusions sont identiques en ce qui concerne les appareils de protection respiratoire. La théorie prévoit que la pénétration de l'aérosol ultra-fin au niveau de fuites faciales devrait être inférieure à celle d'un gaz ou à celle de l'aérosol test actuellement utilisé, en raison d'un dépôt par diffusion, mais aucune confirmation expérimentale n'a été trouvée.

Compte tenu du développement rapide des nanotechnologies et de l'utilisation croissante des particules ultra-fines dans de nombreux domaines, la connaissance et l'amélioration de la filtration de ces polluants est un sujet faisant l'objet de recherches actives.

Bibliographie

- Alonso M, Alguacil FJ (1999). Filtration of unipolarly charged aerosol nanoparticles with an initially discharged dielectric screen. *J Colloid Interf Sci* **216**, 71-76.
- Anonyme (1995). Pollution par les moteurs diesel lors de la construction de tunnels. VERT, bulletin n°2.
- Balazy A, Podgorski A, Gradon L (2004). Filtration of nanosized aerosol particles in fibrous filters. I- Experimental results. Abstracts of the European Aerosol Conference. *J Aer Sci* S967-S968.
- Baron PA, Willeke K (2001). Aerosol measurement, Principles, Techniques and Application, 2nd edition, Willey-Interscience.
- Brown RC (1993). Air Filtration. Pergamon Press, Oxford.
- Callé S (2000). Influence des cycles de colmatage et décolmatage sur l'évolution des performances des médias filtrants utilisés en dépoussiérage industriel, Doctorat INPL.
- Clement CF (1995). Aerosol penetration through capillaries and leaks : theory. *J Aer Sci* **26** (3), 369-385.
- Contal P (1993). Les techniques du dépoussiérage, Réseau Firtech Ingénierie et Procédés.
- Del Fabro L (2002). Modélisation des écoulements d'air et du colmatage des filtres plissés par des aérosols solides. Thèse de l'Université Paris XII.
- EN 779 (2002). Filtres à air de ventilation général pour l'élimination des particules – Détermination des performances de filtration. AFNOR.
- EN 1822-5 (2000). Filtres à air à très haute efficacité et filtres à air à très faible pénétration (HEPA et ULPA). AFNOR.
- EN 143 (1991), Appareils de protections respiratoires – Filtres à particules, AFNOR.
- NF EN 12942 (1998). Appareils filtrants à ventilation assistée avec masques complets, demi-masques ou quarts de masques. Exigences, essais, marquages. AFNOR.
- NF EN 13274-1 (2002), Appareils de protections respiratoire – Partie 1 : Détermination de la fuite vers l'intérieur et de la fuite totale vers l'intérieur. AFNOR.
- Frising T (2004). Étude de la filtration des aérosols liquides et des mélanges d'aérosols solides et liquides, Doctorat INPL.

- Guichard JC (non daté). Guide de la filtration de l'air, Société française de filtration. Éditeur IDEXPO.
- Heim M, Mullins BJ, Wild M, Meyer J, Kasper G (2005). Filtration Efficiency of Aerosol Particles below 20 Nanometer. *Aerosol Sci Technol* **39**, 782-789.
- Hinds WC (1999). Aerosol Technology. Properties, Behavior and Measurement of airborne particles. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 483 p.
- Hinds WC, Kraske G (1987). Performance of dust respirators with facial seal leaks. 1 - Experimental. *Am Ind Hyg Assoc J* **48(10)**. 836-841.
- Ichitsubo H, Hashimoto T, Alonso M, Kousaka Y (1996). Penetration of Ultrafine Particles and Ion Clusters Through Wire Screens. *Aerosol Sci Technol* **24**, 129-134.
- Japuntich DA, Stenhouse JIT, Liu BYH (1994). Experimental results of solid monodisperse particle clogging of fibrous filters. *J Aer Sci* **25**, 385-393.
- Letourneau P, Vendel J, Mulcey P (1988). Prédiction de l'évolution de la pression différentielle et de l'efficacité d'un filtre THE au cours de son colmatage. Filtra 88, Paris.
- Liu BYH, Rubow KL (1990). Efficiency pressure drop and figure of merit of high efficiency fibrous and membrane filter media. 5th World Filtration Congress, Nice, Vol 3, 112-119.
- Malet J (1997). Transport et dépôt des aérosols nanométriques : application à la fraction libre des descendants à vie courte du radon. Doctorat de l'université de Paris XII.
- Morton DAV, Mitchell JP (1995). Aerosol penetration through capillaries and leaks : experimental studies on the influence of pressure. *J Aer Sci* **26 (3)** 353-367.
- Pénicot-Baugé (1998). Étude de la performance de filtres à fibres lors de la filtration d'aérosols liquides ou solides submicroniques. Doctorat INPL.
- Purchass DB (1997). Handbook of Filter Media, Elsevier Science LTD.
- Renoux A, Boulaud D (1998). Les Aérosols, Physique et Métrologie. Technique et Documentation, Lavoisier.
- Skeptsov AS, Baklanov AM, Dubtsov SN et coll. (1996). An experimental study of thermal rebound effect of nanometer aerosol particles. *J Aer Sci* **27 (Suppl 1)** 145-146.
- Thomas D (2001a). Étude de la filtration des aérosols par des filtres à fibres. HDR- Université Henri Poincaré.
- Thomas D, Pénicot P, Contal P, Vendel J., Leclerc D (2001b). Clogging of fibrous filters by solid aerosol particles. Experimental and modelling study. *Chem Engin Sci* **56**, 3549-3561.
- Vaughan NP, Tierney AM, Brown RC (1994). Penetration of 1.5-9.0 diameter monodisperse particles through leaks into respirators. *Ann Occup Hyg* **38 (6)** 879-893.
- Walsh D.C., Stenhouse I. (1996). Experimental studies of electrically active fibrous filter loading. *Part. Part. Syst Charact* **13**, 47-53.
- Wang HC (1996). Comparison of Thermal Rebound Theory With Penetration Measurements of Nanometer Particles Through Wire Screens. *Aerosol Sci Technol* **24**, 129-134.
- Wang HC, Kasper G (1991). Filtration efficiency of nanometer-size aerosol particles. *J Aer Sci* **22** 31-41.
- Weber A, Willeke K, Marchioni R, Myojo T, McKay R, Donnelly J, Liebhaver F (1993). Aerosol penetration and leakage characteristics of masks used in the health care industry. *Am J Infect Control* **21** 167-173.
- Witschger O (2005). Aérosols ultra-fins, nanoaérosols. Comportement et caractérisation. ARET-Actualités, décembre 2005, pp. 7-18.

4. Généralités sur les propriétés de surface

B. Fubini

4.1. Rôle de la surface dans les interactions particules/matière vivante

Les PUF ne doivent pas être considérées comme un groupe uniforme de substances, mais comme des structures complexes, chacune avec son potentiel de toxicité (Hoet et coll., 2004 ; Colvin, 2003).

Les particules – grandes ou petites – ne sont pas des molécules, mais des agrégats exposant en surface des fonctionnalités chimiques qui ne sont pas nécessairement identiques à celles présentes en profondeur (Jefferson, 2000). Les différentes propriétés de surface influencent l'activité de ces particules en milieu biologique ; par exemple la capacité à produire une réponse inflammatoire peut être mise en corrélation avec l'activité radicalaire (Donaldson et coll., 2001). Il faut distinguer entre toxiques particulières et toxiques moléculaires (tableau 1.XIII ; Fubini, 1997).

La particule inhalée présente donc plusieurs interactions en milieu biologique, soit avec les fluides extracellulaires, soit avec les cellules, la plupart se produisant *à la surface* de la particule. Le cadre généralement accepté par la communauté scientifique pour le mécanisme d'action des particules inhalées dans le poumon est le suivant (figure 1.20 ; Fubini et Hubbard, 2003).

La particule atteint les alvéoles et est déposée dans le fluide pulmonaire.

Étape 1 : réaction avec les molécules extracellulaires, notamment les antioxydants acide ascorbique et glutathion ; adsorption de surfactants ou de protéines.

Toxique moléculaire (par exemple : benzène, HAP)	Toxique particulaire (par exemple : amiante, silices, PM _{2,5})
La structure moléculaire des substances détermine leur réactivité et donc leur toxicité	Les sites de surface sont impliqués dans le mécanisme de toxicité, lequel dépend de l'histoire du solide, et non seulement de sa composition chimique
Mécanisme unique d'action au niveau moléculaire	Plusieurs interactions particule/milieu biologique dans différents compartiments

Tableau 1.XIII. Comparaison entre toxiques moléculaires et toxiques particulières.

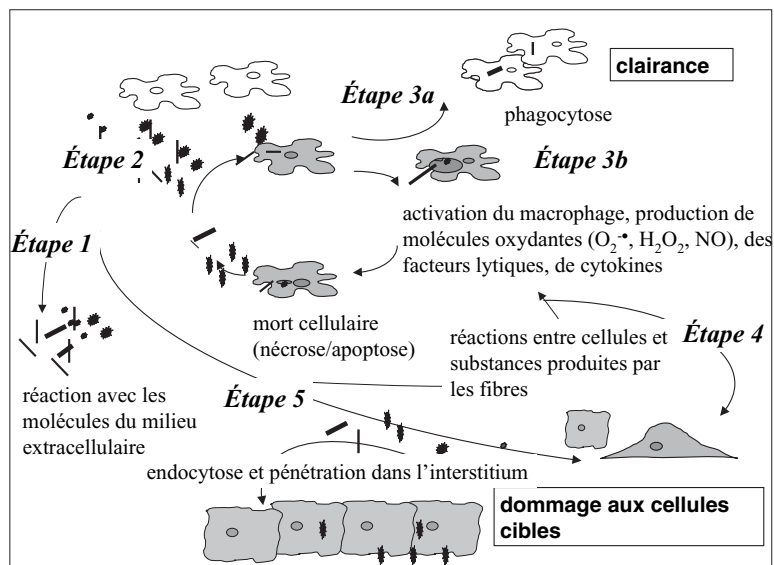


Figure 1.20. Schéma des interactions possibles entre la particule inhalée et le milieu biologique.

Étape 2 : internalisation dans les macrophages alvéolaires, formation du phagolysosome.

Différents cas de figure peuvent ensuite se produire selon la réactivité de surface de la particule.

Étape 3a : la surface de la particule est inerte vis-à-vis de la membrane du phagosome et du milieu intracellulaire : épuration et fin du processus.

Étape 3b : activation du macrophage, production de molécules oxydantes ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO), de facteurs lytiques, de cytokines, suivie par la mort du macrophage et le dépôt de son contenu sur les cellules cibles (épithéliales) : la particule est libre pour un nouveau cycle d'ingestion/ré-ingestion.

L'étape 3b comporte une réaction inflammatoire persistante, qui peut donner lieu soit à une génotoxicité secondaire, suivie d'un développement de néoplasies (cancer bronchique), soit à la production de facteurs de croissance (par exemple fibrosants, comme dans la silicose), ou l'initiation d'une réaction auto-immune.

Étape 4 : le contenu du macrophage endommage les cellules cibles.

Étape 5 : action directe de la particule sur les cellules cibles (épithéliales), par exemple formation de radicaux libres. Cette étape peut entraîner une génotoxicité directe, suivie aussi par des néoplasies (Rahman, 2003).

Dans plusieurs des interactions ici décrites, notamment l'adsorption dans le milieu extra- ou intra-cellulaire (étape 1), et l'action directe, par exemple de radicaux libres, sur

les cellules cibles (étape 5), tout se passe à la surface de la particule : la dose pour les tests *in vitro* et *in vivo* doit donc être exprimée en termes de surface exposée, et toute comparaison entre particules devrait être faite à surface exposée égale. En revanche, les étapes 3 et 4, où la particule agit une fois internalisée par le macrophage, peuvent être déterminées soit par la surface, soit par le nombre de particules.

Le processus d'internalisation des particules dans les macrophages alvéolaires (étape 2) est saturable. Ceci peut être vérifié par exposition chronique, laquelle peut entraîner une cessation quasi complète de la clairance pulmonaire, due à la surcharge des macrophages.

Par ailleurs, les PUF sont moins rapidement phagocytées par les macrophages alvéolaires que les particules fines ; en revanche, elles sont souvent internalisées (endocytose) par des cellules épithéliales (étape 2), qui peuvent en être endommagées (par exemple inflammation, mutagenèse).

Pour la surface, on peut évoquer deux situations limites :

- peu réactive et peu membranolytique : il y a alors conservation de l'intégrité du phagolysosome et épuration ; ou bien
- réactive et membranolytique : il y a alors activation, suivie de la mort du macrophage, relargage d'oxydants, de cytokines et de facteurs de croissance.

Naturellement, la réalité, plus complexe, se situe entre ces deux extrêmes. La relation entre la charge des macrophages (en masse ou en nombre de particules) et l'intensité de la réponse n'est pas encore établie, mais on peut envisager que l'activation se poursuive même avec peu de matière internalisée. Ce serait alors le nombre et non la surface des particules qui commanderait l'intensité de la réponse du macrophage.

4.2. Évaluation de la surface

Quelle mesure de la surface spécifique d'un échantillon devra-t-on considérer ? La surface d'un fullerène, d'un échantillon de TiO_2 ou d'un cristal de quartz – lisse et polie – peut être évaluée aisément, soit à partir de la forme géométrique de la particule, soit en employant la méthode BET, ou d'autres techniques. La méthode BET consiste dans l'adsorption à basse température d'azote ou de krypton à la surface de l'échantillon (voir chapitre 2, point 1.2.1) ; elle est largement employée pour les particules fines ou ultrafines, mais ne peut l'être pour les aérosols. Dans ce cas, l'observation directe des particules au microscope à transmission (TEM) est largement la meilleure méthode. Mais en présence de pores, structures fractales, ou autres crevasses, de tailles inférieures à celles des cellules, et parfois même des protéines, quelle est la surface à prendre en compte, « géométrique » ou bien celle évaluée par la méthode BET (qui mesure les surfaces interne et externe) ? Cela dépend du modèle d'interaction considéré.

4.3. Propriétés de surface impliquées dans la réponse biologique

Toutes les caractéristiques de surface peuvent jouer un rôle dans la réaction biologique, mais les plus impliquées dans la toxicité des particules sont les suivantes (figure 1.21 ; Fubini et Otero-Arèan, 1999) :

- présence de sites actifs à la surface – ions métalliques, radicaux de surface, molécules organiques fortement liées – où la génération ou la production catalytique des radicaux libres ont lieu (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Stohs et Bagchi, 1995 ; Fubini, 1998 ; Kumagai et Schimojo, 2001) ;
- caractère hydrophile/hydrophobe, qui régit l'adsorption des macromolécules (Malmsten, 1995 ; Gray, 2004) et l'épuration (étape 3-1 de la figure 1.19) ;
- sites de surface capables de former de fortes liaisons hydrogène, impliquées dans la rupture de la membrane cellulaire (Nash et coll., 1966) ;
- sites de surface qui réagissent avec – et donc détruisent – les molécules antioxydantes (comme l'acide ascorbique ou le glutathion), défenses naturelles contre le « stress oxydant » (Fenoglio et coll., 2000, 2003) ;
- charges superficielles qui jouent un rôle primaire à différents niveaux (Hoet et coll., 2001 ; Nemmar et coll., 2002) notamment dans l'interaction avec les membranes cellulaires et dans l'adsorption des protéines.

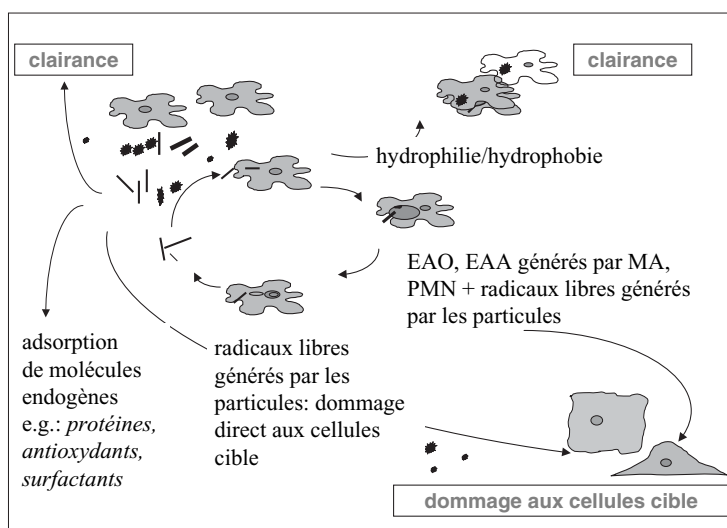


Figure 1.21. Propriétés de surface impliquées dans la réponse biologique et leur rôle au niveau cellulaire.

4.4. Particularités des PUF par rapport aux particules micrométriques

Les PUF ne sont pas seulement des particules plus petites ; mais, en passant de la dimension micronique à la nanométrique, quelques points doivent retenir l'attention :

- la comparaison entre particules microniques et nanométriques doit être faite en surface exposée équivalente pour tenir compte de la surface beaucoup plus grande des particules nanométriques (Oberdörster, 1992) ;
- la réactivité des particules nanométriques est particulièrement élevée par rapport aux microniques à cause du rapport élevé entre atomes à la surface/atomes présents dans la masse (figure 1.22) ;

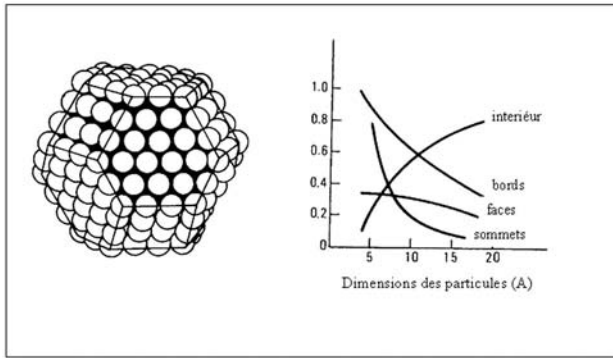


Figure 1.22. La fraction des atomes ou ions présents à la surface, à qui il manque des liaisons, augmente lorsque la taille diminue. Exemple d'un cube octaédrique formé d'atomes métalliques (à gauche) : évolution des rapports atomiques des particules métalliques en fonction des dimensions (à droite).

- la taille des PUF est non seulement nettement inférieure à celle des cellules, mais du même ordre de grandeur, et parfois plus petite, que celle des protéines. L'interaction de la particule avec la membrane ou l'adsorption des protéines se produit donc dans un cadre très différent du cadre usuel. Les PUF peuvent interagir sélectivement avec une protéine membranaire et déclencher des messages cellulaires spécifiques. Quant à l'adsorption de macromolécules, on dira que les PUF sont adsorbées sur une protéine plutôt que l'inverse.

4.5. Agglomération des particules

Les particules ultrafines ont souvent une plus forte tendance que les autres à l'agglomération, formant des agrégats de dimensions parfois micrométriques, qui peuvent agir

vis-à-vis des cellules comme une micro-particule unique de structure poreuse, si les forces d'attraction entre particules sont fortes. Il est donc important de connaître l'intensité de ces forces, ainsi que de connaître le temps entre le relargage des PUF dans l'atmosphère et leur agrégation.

Bibliographie

- Colvin VL (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol* **21**, 1166-1170.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W (2001). Ultrafine particles. *Occup. Environ. Med.*, **58**, 211-216
- Fenoglio I, Martra G, Coluccia S, Fubini B (2000). On the possible role of ascorbic acid in the oxidative damage induced by inhaled silica particles. *Chem Res Toxicol* **13**, 971-975.
- Fenoglio I, Fonsato S, Fubini B (2003). Reaction of cysteine and glutathione (GSH). At the freshly fractured quartz surface : a possible role in silica related diseases? *Free Rad Biol Med* **35**, 752-762.
- Fubini B (1997). Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ Health Perspect* **105 (Suppl. 5)**, 1013-1020.
- Fubini B (1998). Surface chemistry and quartz hazard. *Ann Occup Hyg* **42**, 521-530.
- Fubini B (1998). Health effects of silica. In *The surface properties of silicas (Legrand JP ed)*. chap 5, pp 415-464, John Wiley and Sons, Chichester.
- Fubini B, Otero-Aréan C (1999). Chemical aspects of the toxicity of inhaled mineral dusts, *Chem Soc Rev* **28**, 373-381.
- Fubini B, Hubbard A (2003). Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS). Generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Rad. Biol Med* **34**, 1507-1516.
- Gray J (2004). The interaction of proteins with solid surfaces, *Current Opinion in Structural Biology* **14**, 110-115.
- Jefferson DA (2000). The surface activity of ultrafine particles. *Philos Trans Math Phys Engin Sci* **358**, 2683-2692.
- Kumagai Y, Schimojo N (2001). Induction of oxidative stress and dysfunction of nitric oxide-dependent vascular tone caused by quinones contained in Diesel exhaust particles. *J Health Sci* **47**, 439-445.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, London.
- Hoet PH, Gilissen L, Nemery B (2001). Polyanions protect against the in vitro pulmonary toxicity of polycationic paint components associated with the Ardystil syndrome. *Toxicol Appl Pharmacol* **175**, 184-190.
- Hoet P, Nemmar A, Nemery B (2004). Health impact of nanomaterials? *Nat Biotechnol* **22**, 19.
- Malmsten M (1995). Ellipsometry studies of the effects of surface hydrophobicity on protein adsorption. *Coll Surface* **3**, 297-308.
- Nash T, Allison AC, Harington JS (1966). Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity. *Nature* **210**, 259-261.

- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PHM, Dinsdale D, Smith T, Haiyan X, Vermeylen J, Nemery B (2002). Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Respir Crit Care Med* **166**, 998–1004.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury : studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193-199.
- Rahman I (2003). Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol* **36**, 95-109.
- Stohs SJ, Bagchi D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **18**, 321-336.

5. Aperçus pour quelques autres propriétés

B. Hervé-Bazin

Le devenir dans l'organisme de particules de taille micronique et peut-être plus encore de PUF, est fortement régi par leurs propriétés physicochimiques. Ces dernières peuvent intervenir chacune pour sa part ou en interaction, à une étape ou une autre des interactions biologiques, et de manière et avec une intensité qui dépendent d'autres facteurs, par exemple la dose et le type de cellules exposées.

Certaines de ces propriétés, évoquées par différents auteurs dans cet ouvrage, semblent revenir plus fréquemment ; les plus importantes sont traitées dans les chapitres 7 et 8. D'autres, moins régulièrement impliquées, n'en jouent pas moins des rôles parfois essentiels ; il a donc semblé utile d'en évoquer quelques-unes ici. Pour limiter les développements, n'ont été retenus que la solubilité, les phénomènes d'agrégation/désagrégation et la translocation. Les lecteurs intéressés par ces aspects sont invités à se référer à d'autres ouvrages ou publications pour compléter leur information.

5.1. Solubilité

Cette notion est évoquée par la suite en différents passages de cet ouvrage, notamment à propos de la clairance des particules déposées dans les voies pulmonaires (voir chapitre 3, point 2) et de l'action potentielle des métaux « solubles » ou « non biodisponibles » adsorbés sur ces particules (voir chapitre 8, point 3). Clairance « mécanique » (c'est-à-dire par les macrophages alvéolaires et/ou l'escalator mucociliaire) et dissolution/translocation dans l'organisme sont en effet souvent considérées comme des mécanismes concurrents (Cuddihy et coll., 1979 ; Snipes et coll., 1983 ; Eidson, 1994). De même, il n'est pas légitime d'assimiler solubilité dans l'eau et solubilité dans les liquides biologiques, essentiellement en raison de leurs différences de composition. Il existe de plus des phénomènes « actifs » spécifiques aux milieux biologiques, tels que l'incorporation d'une particule par une cellule (Kreyling, 1990 ;

Oberdörster, 1992 ; Gilmour et coll., 1996) : une dissolution intracellulaire est possible, qui peut différer entre espèces animales (Kreyling et coll., 1990). Bien évidemment, la solubilité *in vitro* d'espèces minérales varie en fonction de la température, du pH, de la taille des particules (parce que la surface exposée augmente lorsque la taille de la particule décroît), de la nature et de l'agitation (ou du renouvellement) du milieu solvant, et d'autres paramètres.

Quelques particularités propres aux PUF sont détaillées dans une publication de Borm et coll. (2006), dont les points principaux sont les suivants :

- 1) La notion même de solubilité est difficile à définir précisément. Quelle est la différence entre molécule ou particule en solution ? entre dispersion de particules monomoléculaires et solution vraie ?
- 2) Si la surface spécifique est importante puisque la dissolution est liée à la surface offerte, des paramètres tels que la courbure ou la rugosité interviennent. Ainsi, les vitesses de dissolution peuvent différer entre une surface convexe et une surface concave ; dans certains cas, la dissolution peut devenir si rapide que la saturation à l'équilibre est localement dépassée, provoquant une reprécipitation de particules plus grosses (phénomène dit de « mûrissement d'Ostwald »).
- 3) Les procédés de préparation des particules de taille ou de forme différentes laissent leur « empreinte » sous forme de défauts locaux (zones de tension, défauts de structure, dislocations), de polluants résiduels (traces d'agents de synthèse, de dispersants), d'états de surface particuliers (orientation cristallographique préférentielle, rugosité, zones passivées...), ce qui peut modifier les caractéristiques de la dissolution.
- 4) Les nanoparticules ont tendance à s'agglomérer, ce qui ralentit la dissolution (et donc accroît la biopersistance). Certains modes d'administration en toxicologie (ou de préparation des échantillons) favorisent l'agglomération (par exemple instillation plutôt que inhalation), ce qui pourrait biaiser les résultats. On ne sait pas selon quels facteurs et dans quelle mesure des agglomérats seront fragmentés (ou formés) dans l'organisme.
- 5) La présence de certaines espèces (ions, protéines, chélatants, par exemple) dans le milieu peut accélérer ou ralentir le processus de solubilisation. En milieu biologique, des processus biochimiques peuvent aussi interférer (par exemple formation de collagène, susceptible d'adhérer à la surface et de la protéger de la dissolution). Par ailleurs, si la particule est internalisée, elle se trouvera dans un milieu totalement différent (par exemple à pH plus acide dans un lysosome).
- 6) La frontière entre particule biosoluble et biopersistante peut être ténue, d'une part parce que le renouvellement du fluide pulmonaire favorise *a priori* la dissolution d'espèces réputées peu solubles, d'autre part parce que la réactivité de surface intervient (exemple des réactivités diversifiées des différentes formes de silices amorphes et cristallines).

Borm et coll. (2006) concluent qu'il « sera nécessaire de mettre au point ou d'adapter des méthodes d'évaluation de la biopersistance en milieu biologique (comme il a été fait pour les fibres), sachant qu'il y a des difficultés à résoudre (mises en évidence d'évolutions morphologiques de nano-objets, de modifications extrêmement ténues du milieu solvant). »

En effet, la persistance dans l'organisme de particules très peu solubles peut impliquer leur translocation vers des organes où elles pourraient s'accumuler ; les conséquences de phénomènes de cette nature ne sont pas encore claires.

Bibliographie

- Borm P, Klaessig FC, Landry TD, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K, Trottier R, Wood S (2006). The Role of Dissolution in Biological Fate and Effects of Nanoscale Particles. *Toxicol Sci.* **90** (1) 23-32.
- Cuddihy RG, Boecker BB, Griffith WC (1979). Modelling The Deposition And Clearance Of Inhaled Radionuclides. In : Biological Implications of Radionuclides Released From Nuclear Industries, Vol. 2, International Atomic Energy Agency, Vienna, pages 77-90.
- Eidson AF (1994). The effect of solubility on inhaled uranium compound clearance : a review. *Health Phys.* **67** (1) 1-14.
- Gilmour PS, Brown DM, Lindsay TG, Beswick PH, MacNee W, Donaldson K (1996). Adverse health effects of PM10 particles : involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup Environ Med* **53** (12) 817-822.
- Kreyling WG, Godleski JJ, Kariya ST, Rose RM, Brain JD (1990). In vitro dissolution of uniform cobalt oxide particles by human and canine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2** (5) 413-22.
- Oberdörster G (1992). Pulmonary deposition, clearance and effects of inhaled soluble and insoluble cadmium compounds. *IARC Sci Publ* 118, 189-204.
- Snipes MB, Boecker BB, McClellan RO (1983). Retention of monodisperse or polydisperse aluminosilicate particles inhaled by dogs, rats, and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **69** (3) 345-362.

5.2. Agrégation/désagrégation

Sauf quand elles sont fortement dispersées, ou quand elles ont reçu un traitement de surface approprié, les PUF ont une tendance naturelle à former des agrégats (liaisons fortes) et des regroupements d'agrégats (agglomérats, liaisons faibles). Cette propriété va dans le sens de la sécurité : une fois agglomérées, ou plus ou moins collées aux parois des récipients qui les contiennent, les PUF ont une tendance diminuée à se disperser dans l'atmosphère. Par ailleurs, les agglomérats se comportent dans l'air comme des particules uniques de taille équivalente, et donc se déposent en proportion moindre que des PUF isolées dans les voies pulmonaires des personnes exposées. Mais, une fois déposés dans l'organisme, comment ces agglomérats vont-ils se comporter ? Vont-ils rester en l'état, ou être réduits en agglomérats plus petits, voire en particules isolées, par

exemple sous l'action du surfactant pulmonaire, ou suite à la phagocytose ? La désagrégation, si elle a lieu, ne va-t-elle pas provoquer un renforcement de la toxicité, notamment si celle-ci est liée au nombre ou à la surface des particules ? ou favoriser une dispersion accentuée dans tout l'organisme, avec le risque de distribution à des organes sensibles comme le cœur, le cerveau, les reins, le foie ?

Selon Oberdörster (1996), « les effets provoqués par les particules dépendent fortement de leur localisation dans le poumon, espace alvéolaire ou interstitium. En ce qui concerne les PUF, leur translocation semble dépendre de la probabilité des agrégats à se désagréger : il y a des éléments indiquant des différences significatives selon qu'elles sont déposées isolées ou agrégées. » (tableau 1.XIV).

	PUF isolées	Agrégats
Dépôt dans les voies respiratoires profondes	Très élevé	Relativement faible (comme pour des particules plus grosses)
Devenir dans le poumon	Principalement l'interstitium	Phagocytose par les MA ; élimination muco-ciliaire ; désagrégation partielle dans l'interstitium ; charge pulmonaire
Effets	Épithélium/ Interstitium/ Endothélium	Alvéole pulmonaire/Interstitium (en chronique)

Tableau 1.XIV. Dépôt et effets pulmonaires de PUF inhalées isolées ou sous forme d'agrégats (Oberdörster, 1996).

Oberdörster (1996) souligne notamment les points suivants :

- les agrégats n'ont pas les mêmes caractéristiques de dépôt dans les voies respiratoires que les particules primaires dont ils sont constitués (voir chapitre 3, point 1) ;
- des particules primaires (PUF) sont plus susceptibles d'être internalisées par des cellules épithéliales que ne le sont des agrégats, plus efficacement détectés et phagocytés par les macrophages alvéolaires ;
- des PUF de TiO_2 , même inhalées sous forme d'agrégats, induisent une réponse biologique plus forte que des particules plus grosses du même TiO_2 , à la même concentration massique ;
- il y a des éléments indiquant que des agrégats de PUF de natures différentes n'ont pas des comportements identiques. Ainsi, des PUF de noir de carbone se désagrégeraient moins facilement dans le poumon profond que celles de TiO_2 pour une même taille de particules primaires, ce qui pourrait expliquer la toxicité relative, inattendue, de nanoparticules de TiO_2 (voir les travaux de Takenaka et coll., 1986).

Plus récemment, Churg et coll. (1998) ont observé que le comportement des agrégats semble complexe, et n'est pas nécessairement identique pour des agrégats de particules fines ou de particules ultra-fines : les agrégats formés par ces dernières résisteraient mieux à la dispersion que ceux des particules fines, dont la taille diminuait dans le temps (échantillons de TiO_2 de tailles respectives 120 ou 21 nm).

Stearns et coll. (2001) ont observé que des PUF de TiO_2 (diamètre 50 nm) avaient tendance à rester agrégées, même après internalisation par des cellules épithéliales pulmonaires de type II, ou utilisation de suspensions diluées (après sonication et temps de repos d'une heure). En sens contraire, Kapp et coll. (2004) ont relevé que des particules de TiO_2 de taille primaire 22 nm n'avaient que peu tendance à s'agglomérer, le diamètre moyen des agglomérats observés (dans les poumons des rats après inhalation) étant seulement de 29 nm. Ces différences pourraient refléter celles des conditions expérimentales (notamment entre suspension aqueuse *in vitro* et inhalation d'un aérosol *in vivo*) ou entre échantillons (traitements de surface différents). Les travaux de Kendall et coll. (2004) avec des PUF de carbone montrent en effet que tant la composition du liquide de suspension (tampon phosphate, dipalmitoylphosphatidylcholine, fibrinogène, albumine) que la surface ou la taille de la particule peuvent jouer un rôle sur l'agglomération des particules.

Il semble que les phénomènes d'agrégation/désagrégation soient plus complexes qu'imaginé, comme le montrent Edetsberger et coll. (2005). Ces derniers, après avoir confirmé que des nanoparticules de taille inférieure à 200 nm peuvent pénétrer dans les cellules sans activation de processus actifs d'internalisation (voir Geiser et coll., 2005, pour des microsphères de polystyrène), observent que des agrégats se reforment progressivement à l'intérieur de la cellule, ce qui pourrait résulter en partie de l'inclusion de PUF isolées ou de petits agrégats dans des vésicules cytoplasmiques. Limbach et coll. (2005) considèrent pour leur part (nanoparticules d'oxyde de cérium et fibroblastes) que les nanoparticules de taille inférieure à 50 nm s'agglomèrent rapidement et sont en fait internalisées sous forme d'agrégats ; la taille est le paramètre principal de la phagocytose. Long et coll. (2006) ont constaté que des PUF de TiO_2 P25 sont internalisées *in vitro* par des microglies sous forme d'agrégats (tailles de 800 à 2 400 nm suivant la concentration). Par ailleurs, Garcia-Garcia et coll. (2005) ont mis en évidence que la distribution intracellulaire des PUF dépend de la composition de leur surface, et Long et coll. (2005) que les effets dépendent de la nature de la particule (particules microniques de carbone ou carbone/fer, et macrophages humains). Lovern et Klaper (2006) ont observé que la mortalité de *Daphnia magna* est marquée quand ces organismes sont exposés à des particules non agglomérées (diamètre moyen des particules de TiO_2 30 nm), et faible en présence d'agrégats (diamètres 100 à 500 nm).

En conclusion, il semble que les connaissances relatives aux conditions d'agrégation/désagrégation de PUF en milieux biologiques et à leurs conséquences sur la toxicité soient encore très insuffisantes pour prévoir ou même rendre compte *a posteriori* des données

toxicologiques. On connaît seulement quelques paramètres importants, parmi lesquels la nature de la particule (composition chimique), la surface (y compris revêtements de surface, volontaires ou acquis par la particule dans son environnement), la taille et la forme, les charges superficielles et la solubilité ; il convient aussi de ne pas oublier que des cellules différentes réagiront probablement différemment en présence de PUF identiques.

Bibliographie

- Churg A, Stevens B, Wright JL (1998). Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO₂ in a tracheal explant system. *Am J Physiol* **274** (1 Pt 1) L81-86.
- Edetsberger M, Gaubitzer E, Valic E, Waigmann E, Kohler G (2005). Detection of nanometer-sized particles in living cells using modern fluorescence fluctuation methods. *Biochem Biophys Res Commun.* **332** (1) 109-116.
- Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Kim HR, Le Doan T, Desmaele D, d'Angelo J, Taran F, Georgin D, Couvreur P (2005). A methodology to study intracellular distribution of nanoparticles in brain endothelial cells. *Int J Pharm.* **298** (2) 310-314.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* **113** (11) 1555-1560.
- Kapp N, Kreyling W, Schulz H, Hof VI, Gehr P, Semmler M, Geiser M (2004). Electron energy loss spectroscopy for analysis of inhaled ultrafine particles in rat lungs. *Microsc Res Tech* **63** (5) 298-305.
- Kendall M, Brown L, Trought K (2004). Molecular adsorption at particle surfaces : a PM toxicity mediation mechanism. *Inhal Toxicol* **16** (Suppl. 1) 99-105.
- Limbach LK, Li YC, Grass RN, Brunner TJ, Hintermann M, Muller M, Gunther D, Stark WJ (2005). Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts : Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations. *Environ Sci Technol* **39** (23), 9370-9376.
- Long JF, Waldman WJ, Kristovich R, Williams M, Knight D, Dutta PK (2005). Comparison of ultrastructural cytotoxic effects of carbon and carbon/iron particulates on human monocyte-derived macrophages. *Environ Health Perspect* **113** (2) 170-174.
- Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B (2006). Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2) : Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. *Environ Sci Technol* **40** (14) 4346-4352.
- Lovern SB, Klaper R (2006). Daphnia magna mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* **25** (4), 1132-1137.
- Oberdörster G (1996). Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhal Toxicol* **8** (Suppl.) 73-89.
- Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ (2001). Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24** (2) 108-115.
- Takenaka S, Dornhofer-Takenaka H, Muhle H (1986). Alveolar Distribution of Fly Ash and of Titanium Dioxide after Long-Term Inhalation by Wistar Rats. *J Aerosol Sci* **17** (3) 361-364.

5.3. Translocation et taille

Le tableau 1.XV résume les données expérimentales relevées par Oberdörster et coll. (2005) sur cette question.

Taille des particules (nm)	Nature	Translocation	Localisation/ Effet	Référence
5 - 20	Or, recouvert d'albumine	Oui	Via cavéoles	Mehta et coll., 2004
8	Or, recouvert d'albumine	Oui	Via « vésicules »	Konig et coll., 1993
8	Or, recouvert d'albumine	Oui	Via cavéoles	Heckel et coll., 2004
18	Iridium	Oui ^a	Extrapulmonaire	Kreyling et coll., 2002
30	Or	Oui	Plaquettes ?	Berry et coll., 1977
35	Carbone	Oui	Foie	Oberdörster et coll., 2002
60	Polystyrène ^b	Oui	Thrombus rapide	Nemmar et coll., 2002 ; Silva et coll., 2005
60	Polystyrène	?	Absence de thrombus	Nemmar et coll., 2002
80	Iridium	Oui ^a	Extra-pulmonaire	Kreyling et coll., 2002
240	Polystyrène, lécithine	Oui	Monocyte	Kato et coll., 2003
240	Polystyrène, non recouvert	Non		Kato et coll., 2003
400	Polystyrène	Non	Thrombus tardif	Nemmar et coll., 2003*

Tableau 1.XV. Les propriétés chimiques du revêtement de surface, la charge, et la taille gouvernent la translocation (Oberdörster et coll., 2005, tableau 4 ; a : indications minimales, b : indications indirectes).

* Le tableau original mentionne à tort 2004. Les références de la dernière colonne ne sont pas reprises dans la bibliographie.

Selon Oberdörster et coll. (2005), l'analyse globale des travaux montre que la taille de la particule, sa réactivité de surface et peut-être sa charge, gouvernent sa translocation à travers les couches cellulaires et endothéliales.

Une recherche exploratoire de la littérature montre que ce sujet est extrêmement complexe. Meiring et coll. (2005) ont, pour leur part, souligné les points suivants :

- il existe plusieurs mécanismes de translocation. Déjà l'internalisation de particules dans une cellule peut survenir par différentes voies (puits à clathrine, pinocytose, cavéoles). Par exemple, le nombre (600 000 à 900 000) et la taille des cavéoles (50 à 60 nm) des cellules épithéliales pulmonaires permettent d'imaginer la possibilité d'un passage transcytotique rapide de PUF de taille inférieure à 60 nm ;
- les données permettant d'évaluer l'importance de la translocation ne sont pas convergentes, la translocation étant très faible dans certains cas (particules d'iridium marqué ; Kreyling et coll., 2002), notable dans d'autres (PUF de carbone marqué : Oberdörster et coll., 2002) ;
- les phénomènes d'inflammation ont une influence sur la translocation ;
- des particules de taille très faible (par exemple 4 nm) ne sont pas reconnues par le système réticulo-endothélial, et donc pas neutralisées par l'organisme ;
- la question : « Que signifie la translocation en termes d'effets systémiques ? » reste posée.

Pour les lecteurs intéressés, un aperçu de différents mécanismes d'internalisation peut être trouvé dans Geiser et coll. (2005).

À noter que Heckel et coll. (2004) ont montré, à l'aide d'un dispositif expérimental original sur l'animal entier (lapin néo-zélandais), que la translocation de nanoparticules d'or recouvertes d'albumine se produisait après injection intraveineuse puis perfusion limitée de lipopolysaccharide, ce qui induisait la formation d'un œdème pulmonaire et la modification de la perméabilité de la barrière pulmonaire. La translocation de nanoparticules d'or non traitées (taille des particules primaires 5-8 nm) depuis le poumon après inhalation chez le rat était faible (0,03 à 0,06 % de la concentration pulmonaire dans le sang ; Takenaka et coll., 2006).

La translocation de PUF de carbone (Printex 90, diamètre 14 nm) a été observée après instillation intra-trachéale chez des souris ICR femelles dans un travail rapporté de façon préliminaire par Shimada et coll. (2005). Des agrégats apparaissaient rapidement sur les capillaires alvéolaires, puis dans les ganglions lymphatiques 24 heures après instillation.

Un paramètre important de la translocation est la surface de la particule (originelle ou recouverte), au point que l'on peut diriger la particule « où l'on veut » en ajustant ses propriétés de surface, ou en choisissant quel type de molécule biologique va aller se fixer dessus. Le potentiel ζ est également important (s'il est positif).

La taille de la particule joue également un rôle important (Limbach et coll., 2005) ; certains ont signalé un maximum d'internalisation par la cellule aux alentours de 50 nm (Chithrani et coll., 2006 ; Limbach et coll., 2005 ; Osaki et coll., 2004). Il semblerait que les PUF puissent, en deçà d'une taille estimée à environ 200 nm, pénétrer dans les cellules par des mécanismes passifs (Geiser et coll., 2005) que Peters et coll. (2006) ont proposé de nommer « adhérence interactive ».

Enfin, l'inflammation pulmonaire joue aussi un grand rôle dans la translocation des PUF, comme rappelé par Meiring et coll. (Chen et coll., 2006). L'importance de la translocation vers les structures cérébrales (voir chapitre 3, point 4) a encore été récemment soulignée, notamment en raison du lien fortement suspecté entre pollution environnementale marquée et incidence de la maladie d'Alzheimer (Peters et coll., 2006).

Bibliographie

- Chen J, Tan M, Nemmar A, Song W, Dong M, Zhang G, Li Y (2006). Quantification of extrapulmonary translocation of intratracheal-instilled particles in vivo in rats : effect of lipopolysaccharide. *Toxicology*. **222** (3) 195-201.
- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC (2006). Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett* **6** (4) 662-668.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect*. **113** (11) 1555-1560.
- Heckel K, Kieffmann R, Dorger M, Stoeckelhuber M, Goetz AE (2004). Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287** (4) L867-78.
- Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A (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) 1513-1530.
- Limbach LK, Li YC, Grass RN, Brunner TJ, Hintermann M, Muller M, Wendelin DG, Stark JS (2005). Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts : Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations. *Environ Sci Technol* **39**, 9370-9376.
- Meiring JJ, Borm PJA, Bagat K, Semmler M, Seitz J, Takenaka J, Kreyling WG (2005). The influence of hydrogen peroxide and histamine on lung permeability and translocation of iridium nanoparticles in the isolated perfused rat lung. *Particle Fibre Toxicol* **2**, 3.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* **65** (20), 1531-1543.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005). Nanotoxicology : an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **113** (7) 823-839.
- Osaki F, Kanamori T, Sando S, Sera T, Aoyama Y (2004). A Quantum Dot Conjugated Sugar Ball and Its Cellular Uptake. On the Size Effects of Endocytosis in the Subviral Region. *J Am Chem Soc* **126** (21) 6520-6521.

- Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M, Reed W, Rothen-Rutishauser B, Schürch S, Schulz H (2006). Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part Fibre Toxicol* **3**, 13.
- Shimada A, Kawamura N, Kaewamatawong T, Okajima M, Sawada M, Morita T (2005). Electron microscopic study on the translocation of ultrafine carbon black particles at the airway-capillary barrier in lung. *Toxicologist*, résumé n° 1040 (page 212).
- Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Möller W, Behnke-Semmler M, Jennen L, Walch A, Michalke B, Schramel P, Heyder J, Schulz H (2006). Distribution Pattern of Inhaled Ultrafine Gold Particles in the Rat Lung. *Inhal Toxicol* **18(10)** 733–740.

Caractérisation et sources des aérosols ultra-fins

2

1. Caractérisation physique des particules ultra-fines

F. Gensdarmes, O. Witschger

Les particules dispersées dans l'air présentent, par rapport aux polluants gazeux, des spécificités métrologiques en raison de l'intervention de paramètres tels que la taille, la forme, la charge électrique, la concentration dans l'air, etc., le plus important de ces paramètres étant la taille. Il en résulte que la caractérisation des particules dispersées dans l'air est considérablement plus complexe que celle des gaz ou des vapeurs. De plus, la caractérisation des particules ultra-fines (PUF) fait appel à une métrologie fondamentalement différente de celle des particules microniques usuellement employée en hygiène du travail. Au-delà des aspects purement métrologiques, la façon d'évaluer l'exposition professionnelle est remise en cause.

Ce chapitre présente les connaissances relatives à la caractérisation physique des PUF dispersées dans l'air, ainsi que des éléments concernant l'évaluation de l'exposition professionnelle.

1.1. Paramètres pour la caractérisation physique des particules (taille, forme, quantité)

1.1.1. Diamètres équivalents

Les théories de la physique des aérosols sont établies, le plus souvent, pour des particules sphériques (Bricard, 1977a), rares en pratique sauf pour des particules liquides ayant de faibles vitesses de déplacement. C'est pourquoi, pour caractériser simplement les dimensions de particules de formes irrégulières, on définit des diamètres de particules sphériques ayant certaines propriétés équivalentes (masse, volume, vitesse de sédimentation, mobilité électrique, coefficient de diffusion, etc.).

| Diamètre équivalent en masse d_M

Le diamètre équivalent en masse d'une particule quelconque de masse volumique ρ_M est le diamètre de la sphère de même densité et de même masse que la particule.

| Diamètre équivalent en volume d_V

Le diamètre équivalent en volume est le diamètre de la sphère ayant le même volume que la particule, en comprenant les pores non accessibles au fluide environnant.

Pour des particules non poreuses composées d'un seul matériau, le diamètre équivalent en volume est égal au diamètre équivalent en masse. Lorsque les particules sont poreuses, le diamètre équivalent en volume s'exprime à partir du diamètre équivalent en masse par la relation (DeCarlo et coll., 2004) :

$$d_v = d_M \cdot \delta \text{ avec } \delta = \sqrt[3]{\frac{\rho_M}{\rho_p}}, \quad (1)$$

où d_v représente le diamètre équivalent en volume, d_M le diamètre équivalent en masse, ρ_M la masse volumique du matériaux constitutif de la particule, ρ_p la masse volumique de la particule et δ la porosité de la particule.

Pour établir cette relation, il suffit d'exprimer la masse d'une particule M_p en utilisant d'une part, la masse volumique apparente, d'autre part, la masse volumique du matériau constitutif :

$$M_p = \rho_p \cdot \frac{\pi}{6} \cdot d_v^3 = \rho_M \cdot \frac{\pi}{6} \cdot d_M^3 \cdot \quad (2)$$

| Diamètre aérodynamique et diamètre de Stokes

Le diamètre aérodynamique da est défini comme le diamètre de la sphère de densité égale à 1 ayant la même vitesse limite de chute dans le gaz que la particule considérée. Il est relié au diamètre équivalent en volume de la particule par la relation :

$$\rho_0 \cdot da^2 \cdot Cu(da) = \frac{\rho_p}{\chi} \cdot d_v^2 \cdot Cu(d_v), \quad (3)$$

où ρ_0 représente la masse volumique de référence ($\rho_0 = 1\,000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$), ρ_p la masse volumique de la particule, Cu le facteur de correction de Cunningham et χ le facteur de forme dynamique de la particule.

Le facteur de forme dynamique est un paramètre sans dimension défini par le rapport entre la force de traînée exercée sur la particule et la force de traînée exercée sur une sphère de même volume que la particule.

Le diamètre de Stokes est égal au diamètre de la sphère de même vitesse limite de chute et de même masse volumique que la particule considérée. Il est lié au diamètre aérodynamique par la relation :

$$\rho_0 \cdot da^2 \cdot Cu(da) = \rho_p \cdot d_s^2 \cdot Cu(d_s). \quad (4)$$

| Diamètre thermodynamique ou diamètre diffusionnel

Le diamètre thermodynamique (parfois appelé diamètre diffusionnel) est le diamètre de la sphère de même coefficient de diffusion brownienne que la particule considérée. Le coefficient de diffusion d'une particule sphérique s'exprime en utilisant la relation de Stokes-Einstein :

$$D = k \cdot T \cdot B, \quad (5)$$

où D représente le coefficient de diffusion brownienne des particules ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$), k la constante de Boltzmann ($k = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$), T la température (K) et B la mobilité dynamique ($\text{m}\cdot\text{N}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). La mobilité dynamique B d'une particule sphérique de diamètre d_p est donnée par :

$$B = \frac{Cu(d_p)}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_p}. \quad (6)$$

| Diamètre de mobilité électrique

Le diamètre de mobilité électrique est le diamètre de la sphère portant une charge électrique élémentaire et de même mobilité électrique que la particule considérée. La mobilité électrique s'exprime en fonction de la mobilité dynamique par :

$$Z = n \cdot e \cdot B$$

où Z représente la mobilité électrique ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), n le nombre de charges électriques élémentaires portées par la particule et e la charge de l'électron ($e = 1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$).

Le diamètre de mobilité électrique dm est relié au diamètre équivalent en volume par :

$$\frac{dm}{Cu(dm)} = \frac{d_v \cdot \chi}{Cu(d_v)} \quad (7)$$

Pour les particules sphériques, le diamètre de mobilité électrique est égal au diamètre équivalent en volume. En revanche, pour les particules non sphériques, le facteur de forme dynamique est toujours supérieur à 1 et le diamètre de mobilité électrique est supérieur au diamètre équivalent en volume. Pour les particules non sphériques, il n'existe pas une valeur unique du diamètre de mobilité électrique pour un diamètre équivalent en volume fixé. En effet, le diamètre de mobilité électrique dépend de la pression à laquelle la mesure est effectuée, car le facteur de forme dynamique et le coefficient de correction de Cunningham sont des fonctions du nombre de Knudsen (DeCarlo et coll., 2004).

Les relations 3 et 7 permettent de relier le diamètre aérodynamique et le diamètre de mobilité électrique d'une particule par l'intermédiaire de son diamètre équivalent en volume, en fonction de sa masse volumique et de son facteur de forme dynamique.

Si la particule n'est pas sphérique, ou si sa densité est différente de 1, le diamètre aérodynamique da peut être notablement différent du diamètre de mobilité électrique dm ; la figure 2.1 présente l'évolution du rapport dm/da calculé à l'aide des relations 3 et 7 en fonction du diamètre aérodynamique pour des particules de masses volumiques $\rho_p = 1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $4 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ou $10 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, et pour des facteurs de formes dynamiques égaux à 1, 1,2 ou 1,5.

| Diamètre équivalent optique

Le diamètre équivalent optique fait référence aux propriétés des particules éclairées par un faisceau de lumière. En général, ce diamètre correspond au diamètre de la particule sphérique utilisée pour l'étalonnage de l'instrument de mesure. Par exemple, lorsqu'un instrument éclaire une particule par un faisceau de lumière et mesure l'intensité de la lumière diffusée à un certain angle, le diamètre optique équivalent sera celui de la particule sphérique utilisée pour l'étalonnage produisant la même intensité lumineuse au même angle. Renoux et Boulaud (1998) présentent en détail les différentes méthodes de mesure optique des aérosols.

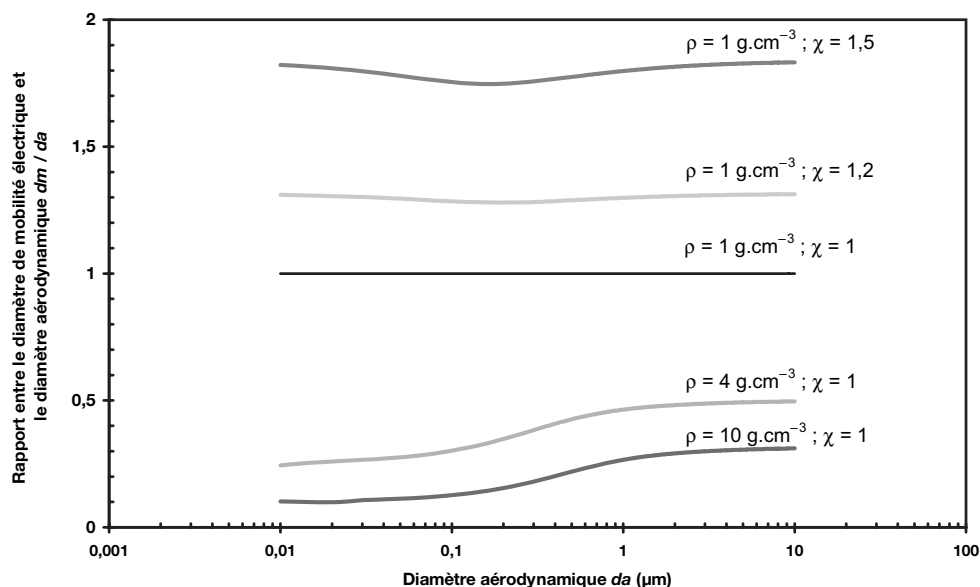


Figure 2.1. Évolution du rapport entre le diamètre de mobilité électrique et le diamètre aérodynamique en fonction du diamètre aérodynamique pour des particules de masses volumiques égales à 1, 4 ou 10 g.cm⁻³ et des facteurs de formes dynamiques égaux à 1, 1,2 ou 1,5.

| Mesure de la taille des particules par microscopie

Pour les mesures réalisées par microscopie, le diamètre équivalent le plus utilisé est le diamètre de surface projetée. Ce diamètre correspond à celui du disque de même surface que celle définie par la projection de la particule suivant un axe ; dans le cas d'une particule de forme irrégulière, sans symétrie, ce diamètre dépend de l'axe choisi pour la projection.

La microscopie est un moyen de caractériser la morphologie de particules de formes complexes, comme celles résultant de l'assemblage de petites particules primaires solides.

1.1.2. Forme des particules

Les particules d'un aérosol, rarement sphériques, sont, dans la plupart des cas, caractérisées par un diamètre équivalent (aérodynamique, mobilité électrique, etc.) ; ceux utilisés classiquement ne suffisent pas toujours pour comprendre le comportement de particules de formes irrégulières. C'est le cas de la coagulation des agglomérats (Friedlander, 2000), ou de leur charge électrique en présence de petits ions (Rogak et Flagan, 1992 ; Jung et

Kittelson, 2005). Il est alors nécessaire de caractériser la forme des particules à l'aide de différents paramètres. Par ailleurs, certaines techniques permettant de déterminer un diamètre équivalent ont une réponse qui dépend de la forme des particules.

| Facteur de forme dynamique

Lorsqu'une particule a une vitesse relative par rapport au fluide porteur, le fluide exerce une résistance au mouvement de la particule (force de traînée). Le facteur de forme dynamique traduit l'augmentation de la force de traînée par rapport au cas d'une particule sphérique de même volume ; il est défini par le rapport entre la force de traînée exercée sur la particule considérée et celle exercée sur la sphère de même volume et de même vitesse relative par rapport au fluide porteur. Pour des particules sphériques, le facteur de forme dynamique est égal à 1 ; il est généralement supérieur à 1 pour des particules non sphériques. Ce facteur dépend de l'orientation de la particule dans l'écoulement (Hinds, 1999). Le tableau 2.I donne les valeurs du facteur de forme dynamique pour quelques particules types (Hinds, 1999 ; Baron et Willeke, 2001).

Particules, formes	Facteur de forme dynamique χ
Sphère	1
Cube	1,08
Agrégat compact de 3 sphères	1,15
Agrégat compact de 4 sphères	1,17
Chaîne de 2 sphères	1,12
Chaîne de 3 sphères	1,27
Chaîne de 4 sphères	1,32
Particules de sable	1,57
Particules d'alumine anguleuse	1,2 à 1,4
Particule d'UO ₂	1,28

Tableau 2.I. Facteurs de forme dynamique pour quelques particules types.

Dans certains cas, le facteur de forme dynamique est défini par le rapport entre la force de traînée exercée sur la particule considérée et celle exercée sur la sphère de même masse et de même vitesse relative par rapport au fluide porteur. Cette définition est principalement utilisée dans le cas des particules présentant des vides internes ; ces vides peuvent correspondre à des pores, ou à des espaces interstitiels pour les agrégats. Les facteurs de formes dynamiques définis à partir des diamètres équivalents en volume et en masse sont reliés par la porosité de la particule ; Baron et coll. (2001) ainsi que DeCarlo et coll. (2004) ont détaillé les relations entre ces paramètres.

| Morphologie fractale des particules

La forme des particules de structure complexe, comme celles issues de combustion ou de réacteurs de synthèse de poudres, peut être caractérisée en termes de dimension fractale. Ces particules sont constituées d'assemblages de particules plus petites, dites particules primaires (figure 2.2).

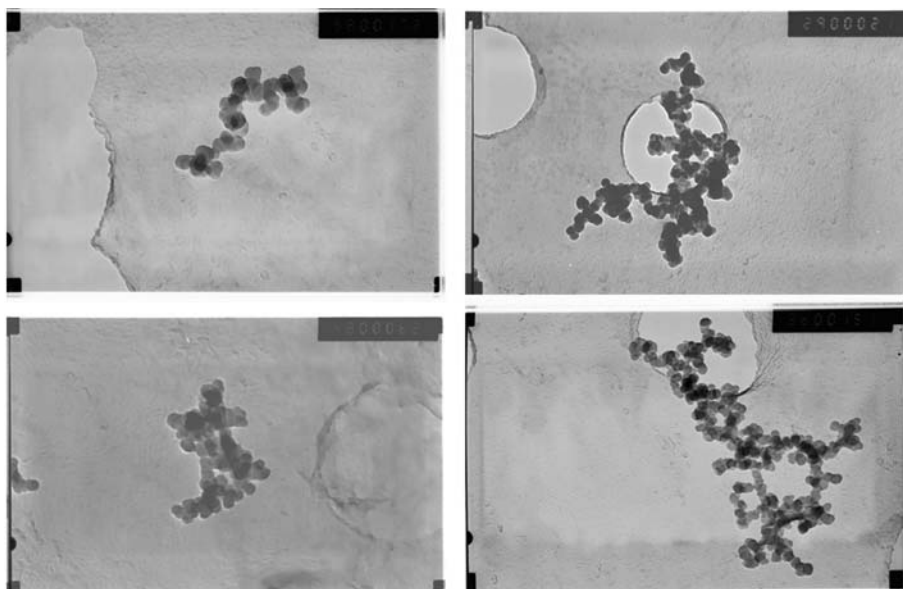


Figure 2.2. Photographies au microscope électronique à transmission d'agrégats issus de la combustion de toluène (Ouf, 2006).

Généralement, on parle d'agglomérat lorsque les particules primaires sont liées entre elles par des forces d'intensité faibles à moyennes (par exemple tension de surface) ; on parle d'agrégat lorsque les liaisons entre les particules primaires ne peuvent pas être rompues facilement. *Dans ce qui suit, le terme agrégat est utilisé de façon générique.*

Les formes des agrégats sont très différentes suivant les mécanismes de production, et elles influencent le comportement physique. Depuis plusieurs années, la théorie fractale a été appliquée à la caractérisation des agrégats.

Pour décrire la formation d'agrégats, plusieurs approches théoriques ont été proposées ; Friedlander (2000) et Baron et coll. (2001) en présentent des synthèses détaillées. Deux catégories d'agrégats peuvent être distinguées : ceux formés suivant un modèle particule-cluster (p-c) et ceux formés suivant un modèle cluster-cluster (c-c), le cluster étant considéré comme un petit agrégat de quelques particules primaires.

Dans le modèle particule-cluster, l'agrégat grossit par collision directe entre des particules primaires et un cluster ; il en résulte généralement un agrégat de forme relativement compacte. Dans le modèle cluster-cluster, l'agrégat grossit par rencontre entre clusters, processus qui conduit à la formation d'agrégats aérés, de faible compacité. On considère que les formes des agrégats obtenus peuvent être caractérisées à l'aide de la théorie fractale. Néanmoins, dans le cas des agrégats issus de processus particule-cluster, la théorie fractale ne s'applique pas aux petits agrégats composés d'un faible nombre de particules primaires (Baron et coll., 2001).

Différents éléments permettent de caractériser les agrégats et leur morphologie fractale.

| Diamètre des particules primaires d_{pp}

Les particules primaires sont les composants élémentaires de l'agrégat. Leur distribution granulométrique est souvent caractéristique de leur processus de formation (combustion, réacteur aérosol pour la synthèse de poudre, etc.). Les particules primaires sont en général des sphères de diamètres de quelques nanomètres à 100 nm. L'ouvrage de Friedlander (2000) décrit les facteurs influençant la taille des particules primaires.

La morphologie d'un agrégat est caractérisée par le diamètre moyen de ses particules primaires d_{pp} , mesuré en analysant des photographies prises au microscope électronique à transmission.

| Nombre des particules primaires

Comme le montre la figure 2.2, les agrégats peuvent comporter des nombres très différents de particules primaires, dont le dénombrement, à partir d'une image en deux dimensions, est délicat ; Baron et coll. (2001) et Ouf (2006) présentent en détail les méthodes permettant de réaliser cette étape.

| Rayon de giration de l'agrégat R_g

Le rayon de giration R_g d'un agrégat caractérise d'une façon globale la position des particules primaires par rapport au centre de masse de l'agrégat ; il est défini par :

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i m_i \cdot r_i^2}{\sum_i m_i}}, \quad (8)$$

où m_i représente la masse de la particule primaire i et r_i la distance entre le centre de masse et la particule primaire i . En général, pour un processus de synthèse donné, on considère que les particules primaires ont toutes la même masse m . Le rayon de giration s'exprime alors par :

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i m \cdot r_i^2}{Ma}}, \quad (9)$$

où Ma représente la masse de l'agrégat.

Dans ce cas, le rayon de giration s'exprime simplement en fonction du nombre de particules primaires N_p :

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i r_i^2}{N_p}}. \quad (10)$$

| Dimension fractale d'un agrégat

La théorie fractale permet de caractériser l'invariance d'une forme examinée à différentes échelles.

Pour une majorité d'agrégats, il a été montré que le nombre de particules primaires N_p est relié au rayon de giration R_g par une fonction de type puissance :

$$N_p \propto R_g^{D_f} \quad (11)$$

où D_f représente la dimension fractale de l'agrégat.

Cette relation traduit bien une invariance de la forme (représentée par la dimension fractale) pour des particules de tailles différentes (nombre plus ou moins important de particules primaires).

Pour appliquer en pratique cette relation et déterminer la dimension fractale d'un agrégat, il faut l'exprimer sous une forme adimensionnelle et définir un coefficient de proportionnalité. Pour cela, on considère que les particules primaires sont monodispersées et que leur diamètre d_{pp} n'a pas d'influence sur la dimension fractale. Dans ces conditions, la relation 11 peut être écrite sous la forme :

$$N_p = A \cdot \left(\frac{2 \cdot R_g}{d_{pp}} \right)^{D_f}, \quad (12)$$

où A représente un coefficient de proportionnalité adimensionnel appelé « préfacteur ». Ce dernier dépend du processus de grossissement de l'agrégat et du nombre de Knudsen ; il peut également dépendre de la dimension fractale (Baron et coll., 2001).

La figure 2.3, empruntée à Ouf (2006), présente des simulations d'agrégats formés suivant différents processus, et les dimensions fractales correspondantes. Généralement, les agrégats de dimension fractale inférieure à 2 sont formés suivant un processus cluster-cluster tandis que ceux de dimension fractale comprise entre 2 et 3 sont formés suivant un processus particule-cluster.

La dimension fractale des agrégats est mesurée suivant trois familles principales de méthodes :

- l'analyse d'images de microscopie ;
- l'analyse de la diffusion de la lumière ;
- l'analyse de plusieurs diamètres équivalents.

L'analyse d'images, souvent considérée comme une méthode de référence (Samson et coll., 1987), est la plus employée. Elle consiste à collecter un échantillon de particules puis à en prendre des photographies au microscope électronique à transmission. Ce dernier est plus adapté que le microscope à balayage car il a une résolution suffisante pour observer des particules primaires de quelques nanomètres et il fournit des images correspondant à une projection fidèle de l'agrégat en deux dimensions.

L'analyse des images permet d'obtenir pour chaque particule, selon différentes techniques (Brasil et coll., 1999), le diamètre, le nombre de particules primaires et le rayon de

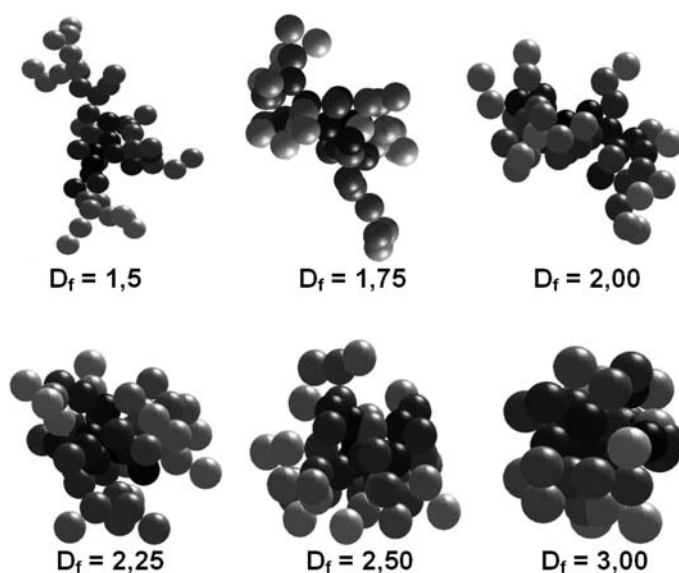


Figure 2.3. Simulation d'agrégats de différentes dimensions fractales.

giration en deux dimensions. Le rayon de giration tridimensionnel est ensuite calculé en utilisant des corrélations obtenues par simulation de la formation d'agrégats et de leurs projections sur différents axes (Koylu et coll., 1995).

Lorsqu'un nombre suffisant de particules est analysé (environ 50), la dimension fractale des agrégats est obtenue en calculant la pente du graphique logarithme du nombre de particules primaires en fonction du logarithme du rapport entre le rayon de giration et le rayon des particules primaires (voir équation 12). La figure 2.4 schématise ces différentes étapes.

Cette technique a été utilisée, par exemple, par Xiong et Friedlander (2001) pour mesurer la dimension fractale d'agrégats d'un aérosol atmosphérique ou, plus récemment, par Ouf (2006) pour caractériser les aérosols émis lors d'un incendie. Cependant, l'analyse d'images est limitée à la caractérisation d'agrégats de dimension fractale inférieure à 2 (agrégat de forme non compacte) pour éviter la superposition de particules primaires ne pouvant être distinguées.

L'analyse de la diffusion de la lumière par les agrégats permet de déterminer leur taille (rayon de giration) et leur dimension fractale ; elle ne nécessite pas la connaissance de

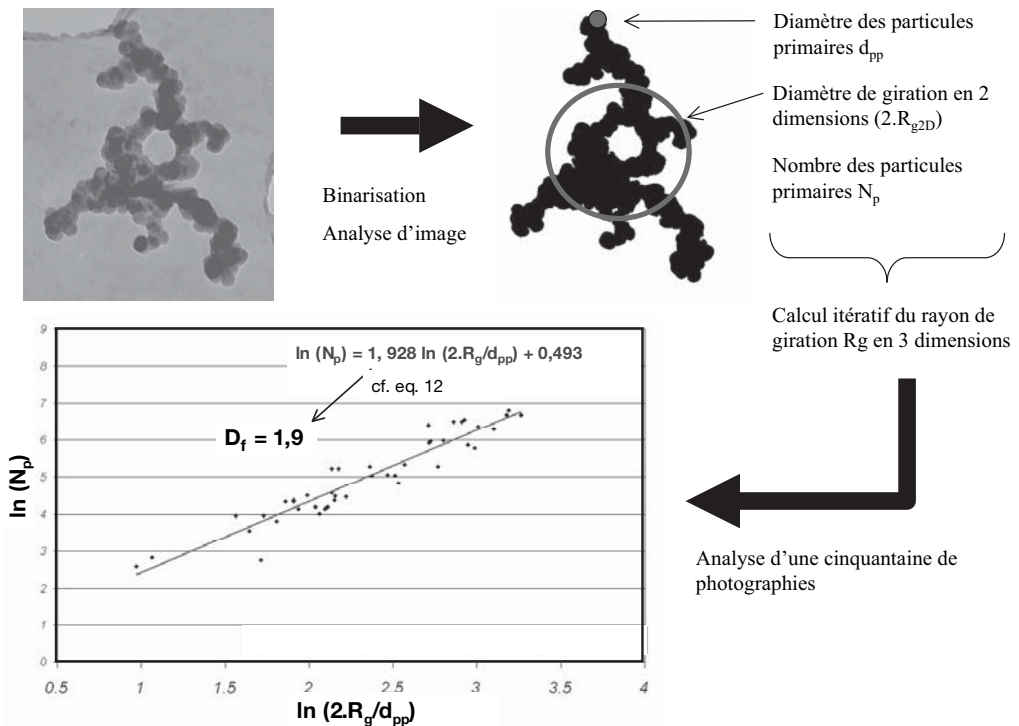


Figure 2.4. Représentation schématique des étapes de la détermination de la dimension fractale d'un ensemble d'agrégats en utilisant la technique par analyse d'images (Ouf, 2006).

l'indice de réfraction des particules et peut être réalisée *in situ*. Cette méthode, développée notamment par Sorensen (1997, 2001), est basée sur la mesure de l'intensité de la lumière diffusée par un agrégat en fonction de l'angle de diffusion θ . Cette intensité, somme des intensités diffusées par chaque particule primaire, dépend de leur arrangement par rapport au centre de l'agrégat et de l'angle d'observation. La théorie de Rayleigh-Gans-Debye (RGD) décrit la diffusion de la lumière par un agrégat en partant des particules primaires et des caractéristiques de l'agrégat (nombre et diamètre des particules primaires, rayon de giration, dimension fractale). Cette théorie néglige les interactions entre particules primaires, notamment la diffusion multiple ; cette approximation est justifiée dans le cas de petits agrégats contenant jusqu'à quelques centaines de particules primaires et de dimension fractale inférieure à 2.

En réalité, pour interpréter les mesures, on exprime l'intensité I de la lumière diffusée par l'agrégat en fonction de la norme du vecteur d'onde de diffusion $q(\theta)$, et non de l'angle de diffusion θ . Ce vecteur est égal à la différence entre l'onde incidente et l'onde diffusée ; l'inverse de sa norme correspond à une longueur caractéristique de l'objet. Lorsque $q(\theta)$ est inférieure à l'inverse du rayon de giration R_g^{-1} (cette situation correspond aux petits angles de diffusion), la théorie RGD montre que l'intensité de la lumière diffusée devient indépendante de θ et proportionnelle au carré du nombre de particules primaires (ou de leur masse). Lorsque $q(\theta) > R_g^{-1}$, l'intensité diffusée décroît suivant une fonction de la forme $q(\theta)^{-D_f}$, puis suivant $q(\theta)^{-4}$ quand $q(\theta)$ est supérieure à l'inverse du rayon des particules primaires $(d_{pp}/2)^{-1}$. La figure 2.5 représente de façon schématique la diffusion de la lumière par un agrégat en fonction de la norme du vecteur d'onde de diffusion.

De façon idéale, l'analyse de l'intensité de la lumière diffusée par un agrégat en fonction de la norme du vecteur d'onde de diffusion permet de déterminer des paramètres tels que le nombre et le diamètre des particules primaires, la dimension fractale et le rayon de giration. Cette technique est principalement utilisée pour déterminer le rayon de giration et la dimension fractale, car l'intensité diffusée est exprimée de façon relative. Il est cependant possible de réaliser des mesures absolues pour obtenir le nombre de particules primaires (Oh et Sorensen, 1997).

L'analyse de plusieurs diamètres équivalents permet de déterminer la dimension fractale des agrégats. Cette méthode repose d'une part sur la relation entre le diamètre de giration de l'agrégat et son diamètre équivalent en mobilité électrique, d'autre part sur une relation entre le diamètre équivalent en mobilité électrique et un autre diamètre équivalent, par exemple le diamètre aérodynamique ou le diamètre équivalent en masse. En effet, les travaux de Schmidt-Ott et coll. (1990) et de Rogak et Flagan (1990) ont montré que l'on pouvait considérer que le rapport entre le diamètre de giration $2 \cdot R_g$ d'un agrégat et son diamètre équivalent en mobilité électrique dm est constant ; l'application des relations 11 et 12 permet alors d'écrire :

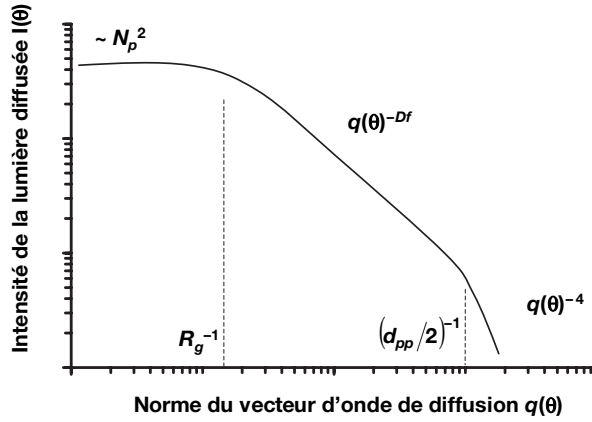


Figure 2.5. Représentation schématique de la diffusion de la lumière par un agrégat.

$$N_p \propto (dm/d_{pp})^{D_f}$$

À partir de cette relation, Kütz et Schmidt-Ott (1990) puis Van Gulijk et coll. (2004) ont montré que le diamètre équivalent en mobilité électrique dm , le diamètre aérodynamique da et la dimension fractale D_f sont liés par :

$$(da/d_{pp}) \propto (dm/d_{pp})^{\frac{D_f - \alpha}{3 - \alpha}}$$

où α représente un coefficient issu de l'expression du facteur de Cunningham.

Cette dernière relation, valide dans le régime transitoire, montre qu'il est possible de déterminer la dimension fractale des agrégats en réalisant des mesures des diamètres dm et da pour plusieurs classes de tailles ; la dimension fractale est finalement obtenue en déterminant la pente du logarithme de da en fonction du logarithme de dm . Cette technique a été utilisée par Skillas et coll. (1998) et Van Gulijk et coll. (2004) pour des suies de moteurs diesels, et par Ouf (2006) pour des agrégats formés lors de la combustion de différentes matières (acétylène, PMMA, toluène).

Pour déterminer la dimension fractale d'agrégats, d'autres utilisent des mesures du diamètre équivalent en mobilité électrique et de la masse (Weber et coll., 1996 ; Park et coll., 2004) ou encore du couple diamètre aérodynamique et masse (Nyeki et Colbeck, 1994).

Le tableau 2.II résume les avantages et les inconvénients des différentes techniques.

Technique	Avantages	Inconvénients
Analyse d'image	Mesure directe du diamètre et du nombre des particules primaires	Collecte et préparation de l'échantillon pour la microscopie. Nombre élevé de photographies, binarisation - Hypothèses pour relier l'analyse en 2 dimensions aux caractéristiques en 3 dimensions. - Méthode limitée aux agrégats de $Df < 2$.
Diffusion de la lumière	Mesure des particules en suspension <i>in situ</i> Mesure du rayon de giration et du nombre de particules primaires	Hypothèse sur la diffusion multiple Méthode limitée aux petits agrégats (au plus quelques centaines de particules primaires) et aux particules de $Df < 2$.
Analyse de diamètres équivalents	Mesure des particules en suspension mais nécessite un conduit de prélèvement. Permet de mesurer des dimensions fractales supérieures à 2	Hypothèse sur le rapport entre le diamètre de giration et le diamètre équivalent en mobilité électrique

Tableau 2.II. Résumé des avantages et des inconvénients des différentes techniques de mesure de la dimension fractale d'agrégats.

1.2. Méthodes de caractérisation des particules ultra-fines dispersées dans l'air

1.2.1. Méthodes de mesure d'un paramètre intégral d'un aérosol

| Mesure de la concentration en nombre

Les compteurs de noyaux de condensation (CNC, ou CPC pour « *Condensation Particle Counter* ») sont les instruments les plus utilisés pour mesurer la concentration en nombre d'un aérosol ultra-fin. Ils permettent de mesurer en continu la concentration en nombre de particules dont le diamètre est supérieur à un minimum, compris entre 3 nm et 10 nm suivant les appareils.

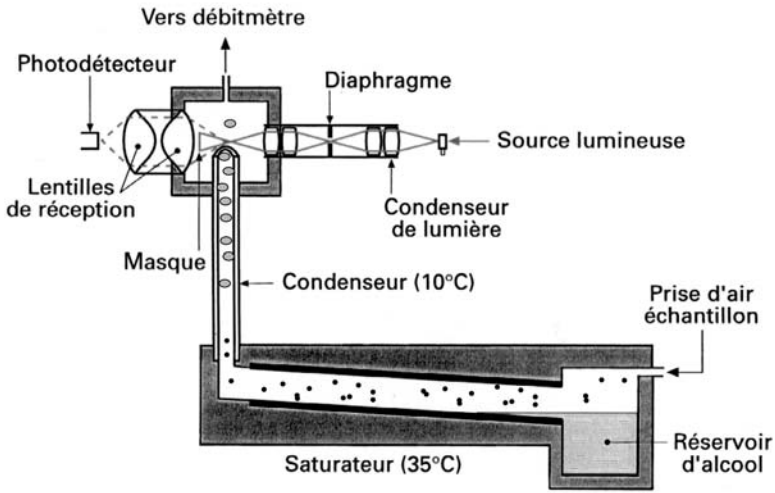


Figure 2.6. Schéma de principe d'un compteur de noyaux de condensation.

Dans un CNC, les particules grossissent du fait de la condensation de vapeurs – le plus souvent de butanol ou d'eau – puis sont détectées par un système optique. Leur taille finale, dépendant principalement du fluide et des conditions opératoires, est de l'ordre d'une dizaine de micromètres. La taille finale des particules de diamètre inférieur à 10 nm dépend également de celle du noyau initial, observation utilisée pour mesurer la granulométrie des particules entre 3 nm et 10 nm (Weber et coll., 1998). Les gouttelettes finales sont majoritairement composées de l'espèce utilisée pour la condensation. La figure 2.6 représente un schéma de principe d'un CNC.

Les CNC peuvent avoir deux modes de détection des gouttelettes : impulsionnel ou photométrique.

Dans le mode impulsionnel, chaque gouttelette est détectée individuellement. Le taux de comptage (particules par seconde) et le débit d'analyse de l'aérosol ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) permettent de calculer la concentration en nombre des particules. L'incertitude sur la mesure peut être déterminée à partir de considérations statistiques sur la probabilité d'effectuer un comptage correct, définie par la loi de distribution de Poisson ; cette dernière indique que l'erreur est égale à $\sqrt{n}$. Par ailleurs, il faut tenir compte de l'incertitude sur le débit d'aérosol échantillonné et de l'efficacité globale du système de grossissement et de détection.

Le mode impulsionnel est adopté lorsque la concentration de l'aérosol est suffisamment faible pour que la probabilité de présence d'une seule particule dans le volume optique soit proche de 1. Lorsque cette probabilité diminue, plusieurs particules peuvent être présentes au même moment dans le volume de détection, et il faut appliquer une correction de coïncidence, fonction de la concentration et du volume de la zone de détection

(Renoux et Boulaud, 1998). Néanmoins, cette approche est limitée car elle considère la situation comme statique ; en raisonnant de façon dynamique, il est évident que la détection d'un événement dans le volume de mesure requiert au préalable une phase où le volume est vide.

Lorsque la concentration de l'aérosol est élevée et qu'il y a en permanence plusieurs particules dans le volume de mesure, le CNC fonctionne en mode photométrique. Dans ce mode, il mesure l'intensité totale de la lumière diffusée par les particules présentes dans le volume de détection optique. Étant donné que, au terme de la phase de condensation, les gouttelettes sont de taille identique et composées majoritairement de la même espèce, on peut relier de façon univoque le nombre de particules présentes dans le volume optique et l'intensité de la lumière diffusée ; un étalonnage est nécessaire. La concentration maximale mesurable est d'environ 10^7 cm^{-3} ; au-delà de cette concentration, l'aérosol évolue très rapidement par coagulation, et se surajoutent des phénomènes d'atténuation et de diffusions multiples non négligeables.

Différents modèles de CNC se différencient notamment par le diamètre minimum des particules pouvant être détectées, le débit d'échantillonnage de l'aérosol dans le volume optique et le temps de réponse de l'instrument. Certains CNC fonctionnent seulement en mode impulsif, ce qui réduit la gamme de concentration mesurable entre 10^3 cm^{-3} et 10^4 cm^{-3} suivant les modèles.

Le diamètre minimum détecté est compris entre 3 nm et 10 nm suivant les types de CNC et leur pression d'utilisation ; il correspond généralement à une efficacité de détection égale à 50 %. Cette valeur limite du diamètre est due aux rapports de saturation très élevés nécessaires pour provoquer la condensation de la vapeur sur les plus petites particules, qui peut entraîner la formation de parasites par nucléation homogène.

| Mesure de la concentration en surface

À l'heure actuelle, on utilise la fixation d'atomes, de molécules ou d'ions sur un aérosol pour obtenir une information sur la surface disponible des particules. Ce procédé ne conduit pas à une mesure de la surface géométrique comme dans le cas de la méthode BET (Brunauer-Emmett-Teller), utilisée pour les poudres, mais à une « surface active » des particules.

Pour mesurer le taux de fixation des atomes, des molécules ou des ions sur les particules, il est nécessaire de mettre en œuvre des techniques spécifiques, actuellement le marquage radioactif et la charge électrique.

Le taux de fixation des atomes ou des molécules sur une particule est déterminé par les probabilités de collision et d'attachement entre les deux entités. On considère que seule la probabilité de collision est fonction de la géométrie de la particule. La probabilité d'attachement est souvent supposée égale à 1, hypothèse vraisemblable pour les grosses

molécules ou les atomes lourds comme le plomb. Dans le cas des ions, on suppose que la probabilité de transfert de charge électrique est égale à 1.

Le taux de fixation d'atomes ou d'ions sur des particules de diamètre d_p s'exprime par :

$$\frac{dn}{dt} = -K \cdot C \cdot n, \quad (13)$$

où n représente la concentration des atomes ou des ions (m^{-3}), C la concentration en particules de diamètre d_p (m^{-3}) et K le coefficient de fixation des atomes ou des ions sur les particules ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$).

Dans le cas de la détection électrique, on mesure la fixation des ions présents dans le gaz sur la particule ; le coefficient de fixation peut être une fonction de la géométrie de la particule et des forces électrostatiques (forces image et de Coulomb). Si les conditions opératoires sont telles que les effets électrostatiques sont négligeables, le coefficient de fixation est fonction uniquement de la géométrie de la particule.

Dans le régime moléculaire, pour des particules sphériques de diamètre d_p inférieur à $0,1 \mu\text{m}$, le coefficient de fixation K s'exprime par :

$$K = \frac{v}{4} \cdot \pi \cdot d_p^2, \quad (14)$$

où v représente la vitesse moyenne d'agitation thermique des atomes ou des ions.

Dans ce cas, le coefficient de fixation est proportionnel à la surface de la sphère ($\pi \cdot d_p^2$). En revanche, en régime continu, pour des particules sphériques de diamètre d_p supérieur à $1 \mu\text{m}$, il est issu de la théorie classique de la coagulation des aérosols (Fuchs, 1964) et proportionnel à d_p .

Plusieurs auteurs ont montré que le taux de fixation des ions ou des atomes s'exprimait en fonction d'un paramètre dit « surface de Fuchs », surface issue de la théorie de la coagulation et correspondant à la section efficace de collision entre les particules et les atomes ou les ions. Pandis et coll. (1991), et plus récemment Jung et Kittelson (2005), ont montré que la surface de Fuchs peut être exprimée par un nombre adimensionnel, fonction du diamètre de mobilité électrique des particules :

$$S_{\text{Fuchs}} = \pi \cdot \left(\frac{d_p}{d_0} \right)^{x(d_p)} \quad (15)$$

expression où d_p représente le diamètre de la particule supposée sphérique, $d_0 = 1 \mu\text{m}$ et $x(d_p)$ est une fonction comprise entre 1 et 2, qui dépend du diamètre des particules.

La section efficace de collision permet, entre autres choses, de déterminer la cinétique d'adsorption ; elle influe sur les réactions chimiques entre les particules et les éléments en phase gazeuse (Baron et coll., 2001). Elle permet également de calculer le coefficient de coagulation et donc le grossissement des particules (voir chapitre 1, point 2).

Physiquement, la section efficace de collision peut être décrite comme la fraction de sa surface géométrique directement accessible par les éléments gazeux environnants ; c'est pourquoi on l'appelle souvent la « surface active ».

Épiphaniomètre

L'épiphaniomètre est un instrument permettant de mesurer la surface active d'un aérosol ; ce nom vient du grec *epiphania* désignant la partie visible (externe) d'un corps.

L'appareil est décrit par Gäggeler et coll. (1989). Le principe de la mesure est basé sur la fixation sur les particules d'atomes de plomb radioactif (^{211}Pb), suivie d'une mesure de radioactivité. Une source d'actinium ^{227}Ac produit du radon 219 (un gaz), mélangé à l'aérosol. Le radon donne en définitive naissance à du plomb 211 (figure 2.7), dont les atomes se fixent sur les particules principalement en fonction de leur concentration et de la surface active de l'aérosol.

La figure 2.8 représente un schéma de principe de l'épiphaniomètre, emprunté à Baltensperger et coll. (2001)

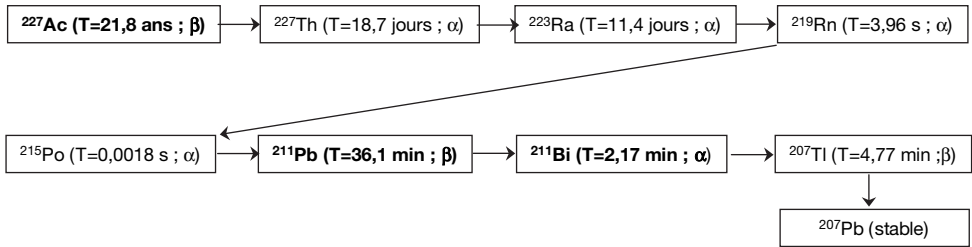


Figure 2 .7. Chaîne de décroissance de l'actinium 227.

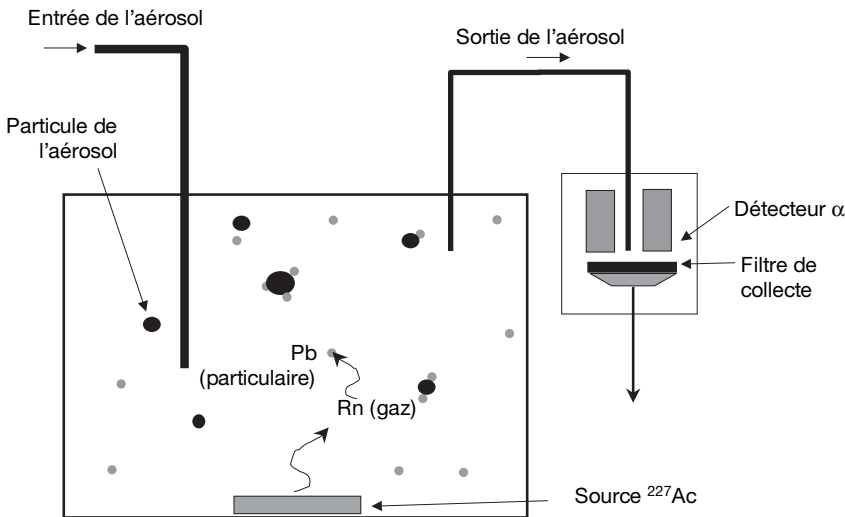


Figure 2.8. Schéma de principe de l'épiphaniomètre.

Le fonctionnement de l'épiphaniomètre est le suivant. L'aérosol est introduit dans un volume où il est mis en contact avec les atomes de ^{211}Pb dont une fraction se fixe sur les particules. Le temps caractéristique de résidence de l'aérosol est en général égal à 2 minutes ; il est ensuite acheminé à travers un tube vers un filtre de collecte. Lors de cette étape, les atomes de ^{211}Pb non fixés sur les particules se déposent par diffusion brownienne sur la paroi du tube. Les particules radioactives déposées sur le filtre sont détectées par un détecteur alpha permettant de mesurer le ^{211}Bi issu de la chaîne de décroissance du ^{211}Pb . Le détecteur mesure également les désintégrations alpha parasites provenant d'autres radioéléments comme le ^{212}Pb issu de la chaîne de décroissance du ^{222}Rn naturellement présent dans l'atmosphère.

Lorsque l'épiphaniomètre fonctionne en régime permanent, c'est-à-dire lorsqu'un aérosol stable est échantillonné, la radioactivité du ^{211}Bi mesurée sur le filtre est en équilibre avec le plomb fixé sur les particules. Pour faire une mesure, l'épiphaniomètre doit procéder au comptage des désintégrations alpha pendant un temps compris entre 5 minutes et 30 minutes, ce qui implique des mesures séquentielles et la prise en compte de la période de décroissance du ^{211}Bi . Finalement, une procédure d'inversion des données permet de calculer l'évolution de la concentration surfacique dans le temps (Pandis *et al.* 1991) à partir des comptages des désintégrations des atomes de ^{211}Bi .

Pour tenir compte de toute la chaîne de mesure de la radioactivité déposée sur le filtre, il est préférable de procéder à un étalonnage de l'appareil avec des aérosols monodispersés, composés généralement de particules sphériques, en mesurant la concentration de référence avec un compteur de noyaux de condensation.

La limite de détection de l'épiphaniomètre dépend du bruit de fond. Pour une faible concentration surfacique d'aérosol, la mesure sera limitée par les erreurs statistiques de comptage. En fonctionnement continu, une incertitude de 10 % sur le comptage correspond à une erreur égale à $0,2 \mu\text{m}^2\cdot\text{cm}^{-3}$ pour un temps d'intégration de 30 minutes.

Limitations du système

Pour que la réponse de l'épiphaniomètre soit proportionnelle à la surface active de l'aérosol, il faut que la concentration en ^{211}Pb soit constante dans le volume de mélange, condition remplie si l'aérosol n'affecte pas la concentration de ^{211}Pb . Dans ce cas, la concentration en ^{211}Pb est pilotée par l'émanation de la source radioactive et le dépôt des atomes sur les parois. Si la concentration surfacique de l'aérosol est trop élevée, l'hypothèse de concentration constante en ^{211}Pb n'est pas valide et un facteur de correction doit être appliqué (Rogak et coll., 1991).

Chargeurs électriques d'aérosol à diffusion

Le principe de la détermination de la surface active d'un aérosol avec ces instruments repose sur la fixation d'ions sur les particules et sur la mesure de la charge électrique résultante (figure 2.9).

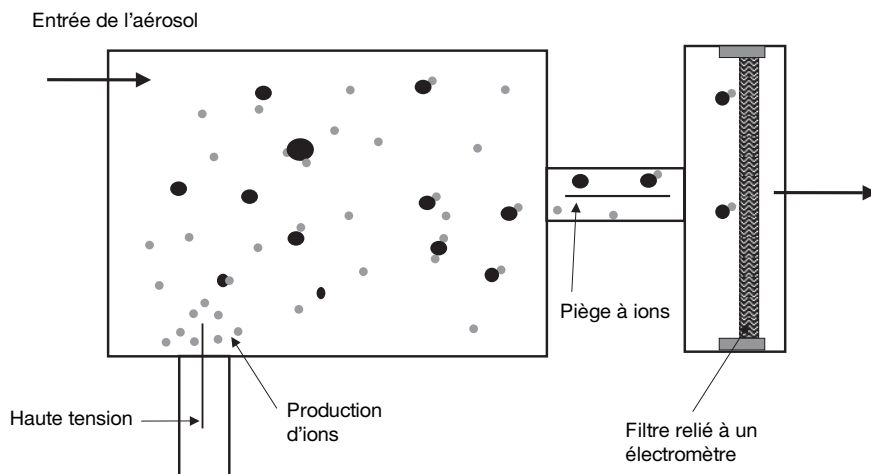


Figure 2.9. Schéma de principe d'un détecteur électrique d'aérosol.

Des ions unipolaires sont créés dans le gaz porteur de l'aérosol par une décharge électrique à effet couronne, généralement à une tension de quelques kilovolts. Les ions se fixent par diffusion brownienne sur les particules, en fonction de leur surface active. Après la section de charge, les ions restant dans le gaz sont piégés par un faible champ électrique et l'aérosol collecté sur un filtre à très haute efficacité. Le flux de particules chargées arrivant sur le filtre produit un courant dont l'intensité est mesurée par un électromètre. La concentration en surface de l'aérosol est calculée à partir du courant et du débit d'échantillonnage.

Dans les détecteurs électriques d'aérosols, une attention particulière est portée à la minimisation des dépôts de particules sur l'électrode produisant les ions ainsi que sur les parois du système.

Par ailleurs, le détecteur électrique doit maintenir une concentration en ions constante dans le gaz pour que le signal électrique soit proportionnel à la surface active de l'aérosol. Ce point est contrôlé par l'ajustement de la tension permettant de produire les ions.

À ce jour, il existe deux systèmes commerciaux pour réaliser ce type de mesure, le LQ1-DC et le EAD ; ils ont été comparés par Jung et Kittelson (2005). Les résultats montrent que le LQ1-DC a une réponse proportionnelle à la surface active des particules pour des diamètres compris entre 30 nm et 150 nm. En revanche, l'EAD surestime d'une façon générale la surface active des particules, et d'autant plus que le diamètre des particules diminue. Dans leurs commentaires, les auteurs mettent en avant les écoulements aérodynamiques et les géométries différentes de chaque instrument.

Est également apparu un instrument destiné à mesurer la concentration en surface des particules *déposées* dans les régions pulmonaires trachéobronchique et alvéolaire (voir

chapitre 3, point 1). Le principe de cet instrument, dénommé NSAM (TSI, 2004), est similaire à celui de l'EAD ; la différence réside dans la tension appliquée dans le piège à ions : en augmentant cette tension, les concepteurs se sont aperçus que la réponse semblait plus proche de la concentration en surface des particules déposées, c'est-à-dire plus proche de ce que pourrait être une dose délivrée au poumon (Han et coll., 2005). Ainsi, deux tensions différentes sont appliquées pour aboutir aux deux réponses recherchées : dose délivrée à la région trachéobronchique et dose délivrée à la région alvéolaire. Il n'existe pas à ce jour de données publiées sur les performances réelles de ce nouvel instrument.

Limitations du système

Il existe de nombreuses sources de biais sur la mesure de la concentration en surface d'un aérosol avec un détecteur électrique.

Comme déjà dit, la concentration en ions doit être maintenue constante, et donc leur taux de production régulé ; l'aérosol ne doit pas être trop concentré pour éviter la saturation de l'électromètre.

Pour que le signal de l'instrument soit proportionnel à la surface active de l'aérosol, la charge électrique doit être acquise par diffusion brownienne, ce qui implique de limiter les charges multiples pour éviter l'apparition de forces électrostatiques. Ce phénomène est surtout sensible pour les particules de diamètre supérieur à $0,1\ \mu\text{m}$; il peut être contrôlé en limitant le temps de résidence de l'aérosol dans le bain d'ions et la concentration des ions. Pour les particules de diamètre inférieur à $10\ \text{nm}$, c'est la force image de l'ion sur la particule qui peut augmenter la probabilité de collision ; ce phénomène dépend également de la nature de la particule, notamment de sa conductibilité électrique.

Pour une concentration en ions donnée, la limite de détection en surface active dépend de la sensibilité de l'électromètre ; classiquement, elle est égale à $10^{-15}\ \text{A}$. Pour mesurer de faibles concentrations surfaciques, il est possible d'augmenter la concentration en ions dans le système, mais cela conduit à accroître les biais dus aux charges multiples acquises par les plus grosses particules.

Les concentrations mesurables avec ces détecteurs sont comprises entre 10 et $2 \times 10^3\ \mu\text{m}^2\cdot\text{cm}^{-3}$.

Chargeur électrique d'aérosol à effet photoélectrique

Ce système repose sur la détection de la charge électrique des particules acquise par effet photoélectrique (Keller et coll., 2001). Comme précédemment, cette charge électrique est détectée lors de la collecte sur un filtre relié à un électromètre.

L'effet photoélectrique correspond à l'émission d'un électron par une particule excitée par un rayonnement ultraviolet. Le flux de photons que reçoit une particule est proportionnel à sa section efficace. L'énergie des photons doit être supérieure au potentiel

d'ionisation du matériau composant la particule, et inférieure au potentiel d'ionisation du gaz afin de ne pas produire de grandes quantités d'ions.

L'électron émis peut être capté par la particule par rétrodiffusion, ce qui ne modifie pas la charge électrique. La probabilité de rétrodiffusion est faible pour les particules de diamètre inférieur à 0,1 μm . En revanche, les particules de diamètre supérieur à 1 μm ne peuvent pas être chargées par effet photoélectrique.

L'effet photoélectrique dépend également de la composition de la particule, et peut être influencé par la présence de molécules adsorbées.

Un instrument permet de réaliser ce type de mesure, le PAS2000 (Matter Engineering, 2002). Quelques mesures simultanées ont été réalisées avec un PAS2000 et avec un LQ1-DC (Kasper et coll., 2000). L'examen du rapport des réponses entre les deux instruments montre la présence d'une signature liée à la composition des particules submicroniques de l'aérosol. Un couplage intégrant les deux systèmes a donc été développé (Kasper et coll., 2001), qui peut être utilisé pour caractériser des émissions particulaires issues de combustion (air intérieur des locaux et environnement extérieur).

Méthode BET

La théorie de Brunauer, Emmet et Teller (1938) permet d'évaluer la surface spécifique d'un échantillon, qui est la surface par unité de masse accessible aux molécules du gaz environnant. Applicable à des surfaces allant de 0,01 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ à 2 000 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, elle est principalement employée pour des poudres (Rouquerol et coll., 2003). Dans le cas des aérosols, il est nécessaire de collecter un échantillon suffisant (par exemple par filtration), ce qui n'est pas facilement réalisé pour des PUF.

Le principe de la méthode est basé sur l'adsorption à basse température de molécules d'un gaz (N_2 , Kr, Ar) à la surface des pores accessibles. Le calcul de la surface spécifique est réalisé à partir du traitement analytique de l'isotherme d'adsorption, qui permet de déterminer le volume des molécules adsorbées en monocouche ; à partir de ce volume, du volume molaire et de la surface d'une molécule du gaz, on peut calculer la surface de l'échantillon. Le gaz le plus employé est l'azote, dont la molécule (N_2) a une surface égale à 0,162 nm^2 à la température de 77 K.

L'échantillon doit être préparé par dégazage sous vide pour évacuer les molécules déjà adsorbées. L'isotherme d'adsorption est ensuite déterminé en injectant de façon successive des quantités connues de gaz et en mesurant après chaque injection la pression d'équilibre. Cette dernière dépend des quantités initiales de molécules injectées et de molécules adsorbées.

Limitation de la méthode BET

La méthode BET peut être appliquée à des particules non poreuses ou macroporeuses (pores de largeur supérieure à 50 nm) ; dans ce cas, la quantité de gaz adsorbée

augmente de façon régulière avec sa pression d'équilibre, ce qui correspond à un épaississement progressif de la couche adsorbée et permet l'identification de l'isotherme d'adsorption d'une monocouche. Avec des particules microporeuses (largeur de pore inférieure à 2 nm), on observe une saturation de l'adsorbant malgré l'augmentation de la pression d'équilibre (ce qui correspond au remplissage des micropores), et l'identification de l'adsorption d'une monocouche n'est pas possible.

Par ailleurs, la molécule N_2 peut interagir avec la surface de certains matériaux ; on recourt alors à l'argon. Dans le cas de très faibles surfaces spécifiques (inférieures à $0,01 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), on utilise du krypton, de faible pression de vapeur saturante ; on optimise ainsi la quantité de gaz adsorbé à chaque injection.

| Mesure de la concentration massique

Prélèvement sur filtre

La méthode la plus simple pour mesurer la concentration massique d'un aérosol consiste à le prélever sur un filtre, à débit fixe et bien déterminé. La pesée du filtre avant et après l'échantillonnage permet de calculer la masse filtrée et par suite la concentration massique, connaissant le débit et le temps de prélèvement. Il faut choisir un média filtrant adéquat en termes d'efficacité de filtration, de perte de charge et de composition. Des précautions particulières sont nécessaires pour déterminer l'incertitude sur la masse des particules collectées et, d'autre part, pour tenir compte de la présence d'une phase volatile des particules ou de vapeur d'eau pouvant être adsorbée sur le filtre et les particules.

Cette méthode donne une mesure de concentration moyenne de l'aérosol sur le temps de prélèvement.

Jauge bêta

La jauge bêta mesure l'atténuation d'un faisceau de particules β à travers un filtre chargé de particules. Les particules β sont produites par une source radioactive ; leur flux est mesuré par un compteur d'électrons. Le nombre d'électrons transmis au travers de l'échantillon décroît lorsque sa densité surfacique augmente ; le principe est synthétisé par Renoux et Boulaud (1998). L'atténuation du faisceau est fonction de l'énergie des particules β , de la densité surfacique de l'échantillon et du rapport entre le numéro atomique et la masse atomique des espèces de l'échantillon. Ce rapport est sensiblement constant pour la plupart des éléments, sauf pour les plus lourds.

Cette méthode est limitée par des artefacts pouvant provenir de l'inhomogénéité du support de filtration ou du dépôt surfacique, ou de la variation du rapport entre le numéro atomique et la masse atomique des espèces recueillies. Sous réserve de temps d'intégration suffisants, elle permet des mesures séquentielles de la concentration.

Microbalances à cristaux piézo-électriques

Certains cristaux, notamment le quartz, vibrent lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique ; la fréquence de vibration dépend en partie de la masse du cristal. La mesure d'une masse d'aérosol est donc possible en collectant les particules sur le cristal et en mesurant la variation de sa fréquence de vibration. Des sensibilités de 10^3 Hz/ μg peuvent être obtenues avec des stabilités de quelques Hertz pour une fréquence propre de cristal de 10 MHz (Boulaud et Renoux, 1998 ; McMurphy 2000).

Ceci nécessite une collecte avec une efficacité et un débit bien déterminés, par impaction pour les particules de diamètre aérodynamique suffisamment élevé, ou par précipitation électrostatique. Les limites de ces systèmes sont liées à l'efficacité de collecte des particules sur le cristal, à leur adhérence, à la surcharge du cristal, ou aux variations de température et d'humidité.

La sensibilité de la méthode permet des mesures sur un temps d'intégration relativement court, et d'accéder à des mesures quasiment en temps réel.

Microbalance à élément oscillant

Le principe de la microbalance à élément oscillant, connue sous le nom de TEOM (pour *Tapered Element Oscilating Microbalance*), est le même que pour celle à cristaux piézo-électriques : on mesure la variation de fréquence d'un élément provoquée par un accroissement de masse. Dans le TEOM, l'élément oscillant est un tube de verre de forme conique mis en oscillation harmonique par un champ électrique. Sur l'extrémité la plus fine du tube est monté un filtre qui collecte les particules ; le gaz filtré passe ensuite à travers le tube et son débit est mesuré en sortie du système. Lorsque le filtre se charge de particules, la masse de l'ensemble tube plus filtre augmente ; cette variation de masse est liée à la variation de fréquence du système, ici mesurée en temps réel à l'aide d'un système optique. Les données sont ensuite intégrées sur un certain temps pour éliminer les fluctuations statistiques.

Cette technique permet de réaliser des mesures de concentration massique avec une sensibilité d'environ $\pm 5 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ pour un temps d'intégration de 10 minutes et un débit de prélèvement de 3 l/min.

La limitation de ce système est principalement due à la surcharge et au colmatage du filtre de prélèvement. L'élément oscillant doit être maintenu à température constante.

Sélection granulométrique

D'une manière générale, pour une mesure de concentration en masse, il est indispensable de séparer la fraction submicronique ou ultra-fine du reste de l'aérosol. Cette séparation est faite à l'aide d'un sélecteur granulométrique placé en amont du média collecteur (un filtre, par exemple) ou d'un dispositif de détection pour une mesure

dynamique (jauge bêta, TEOM). En ce qui concerne le prélèvement sur filtre, il existe plusieurs systèmes de prélèvement de type individuel (Sioutas et coll., 1999) ou bien à poste fixe (Gussman et coll., 2002 ; Kim et coll., 2002) intégrant un sélecteur de type PM_{10} , c'est-à-dire capable d'extraire de l'aérosol capté la fraction massique inférieure à $1 \mu m$. Ces différentes techniques sont encore peu utilisées dans le cadre de mesures en atmosphère de travail. Pour ce qui est de la fraction ultra-fine ($PM_{0,1}$), aucun système n'est à ce jour commercialisé.

Les systèmes à mesure dynamique comme le TEOM ou la jauge bêta doivent également être équipés en amont d'un sélecteur granulométrique. Chakrabarti et coll. (2004) ont mis en œuvre, en environnement urbain, un système couplant une jauge bêta à un sélecteur de type $PM_{0,15}$ développé dans leur laboratoire ; cette approche pourrait être explorée en atmosphères de travail.

1.2.2. Méthodes de mesure de la distribution granulométrique d'un aérosol

| Mesure de la distribution en diamètre aérodynamique

Le diamètre aérodynamique d'une particule permet de caractériser simplement sa vitesse de sédimentation et son inertie, ou temps de relaxation. Ce dernier est le temps nécessaire à une particule pour ajuster sa vitesse à un nouveau champ de force ou à une accélération du fluide porteur.

La vitesse de sédimentation d'une particule V_S s'exprime en fonction de son temps de relaxation τ_p par :

$$V_S = \tau_p \cdot g, \quad (16)$$

où g représente l'accélération de la pesanteur.

Pour mesurer le diamètre aérodynamique des particules, on les soumet généralement à une variation de vitesse du gaz porteur, accélération linéaire ou variation brutale de direction.

Dans les systèmes à accélération linéaire, c'est une petite buse qui permet l'accélération de l'écoulement. La vitesse des particules est acquise en sortie de buse, en mesurant soit le temps de vol entre deux faisceaux laser, soit le temps de résidence dans un faisceau. Plus les particules ont de l'inertie, plus l'écart des vitesses entre le gaz et les particules est important ; cet écart est principalement relié au diamètre aérodynamique des particules. La forme et la densité des particules peuvent jouer un rôle non négligeable suivant le régime d'écoulement induit lors de l'accélération. Il existe plusieurs systèmes

commerciaux (Aerodynamic Particle Sizer, Aerosizer) permettant de réaliser des mesures de diamètre aérodynamiques entre 0,5 μm et 100 μm .

Les impacteurs en cascade utilisent une brusque variation de direction du fluide pour mesurer le diamètre aérodynamique. On force l'aérosol à passer dans des ajutages de diamètre d_j afin d'imposer une vitesse U aux particules. En regard de l'ajutage est positionnée une plaque imposant à l'écoulement une déviation de 90° . Les particules ayant une inertie suffisante impactent la plaque, les autres suivent le flux gazeux. Le nombre de Stokes permet de prédire l'impaction ; ce nombre est fonction du temps de relaxation, de la vitesse des particules et du diamètre de l'ajutage :

$$Stk = \frac{2 \cdot \tau_p \cdot U}{d_j} \quad (17)$$

Si ce nombre est supérieur à une valeur définie par la géométrie de l'impacteur, la particule sera impactée. En plaçant plusieurs étages d'impaction en série, avec des ajutages de plus en plus petits (figure 2.10), on collecte successivement des particules de diamètres aérodynamiques de plus en plus faibles. Néanmoins, le temps de relaxation des particules de diamètre inférieur à 0,3 μm est trop faible pour qu'elles puissent s'impacter. Dans ce cas, une diminution de la pression permet d'augmenter le coefficient de correction de Cunningham et ainsi le temps de relaxation des particules ; les impacteurs à basse pression travaillent à des pressions absolues allant jusqu'à 100 hPa, ce qui permet d'impacter des particules ayant des diamètres aérodynamiques d'environ 30 nm.

La masse des particules collectées sur chaque étage est obtenue par pesée différentielle des plateaux d'impaction, ce qui implique qu'une masse suffisante d'aérosol soit échantillonnée en fonction de la balance utilisée. La mesure donne une valeur moyenne sur le temps de prélèvement. Les impacteurs travaillant à pression atmosphérique permettent de mesurer des granulométries pour des diamètres aérodynamiques compris entre 20 μm et 0,3 μm . Les impacteurs à basse pression mesurent des granulométries pour des diamètres aérodynamiques compris généralement entre 10 μm et 0,03 μm .

En 1992, un impacteur basse pression à détection électrique a été développé par Keskinen et coll. (schéma de principe figure 2.11).

Un chargeur à effet couronne à l'entrée de l'impacteur permet d'imposer une charge électrique aux particules, ensuite détectées par des électromètres. La charge des particules étant fonction de leur diamètre géométrique et leur collecte par impaction fonction de leur diamètre aérodynamique, l'analyse des données nécessite d'établir des relations entre ces deux diamètres, notamment en utilisant la densité des particules.

Les mesures peuvent être réalisées quasiment en temps réel (1 s) avec une bonne sensibilité.

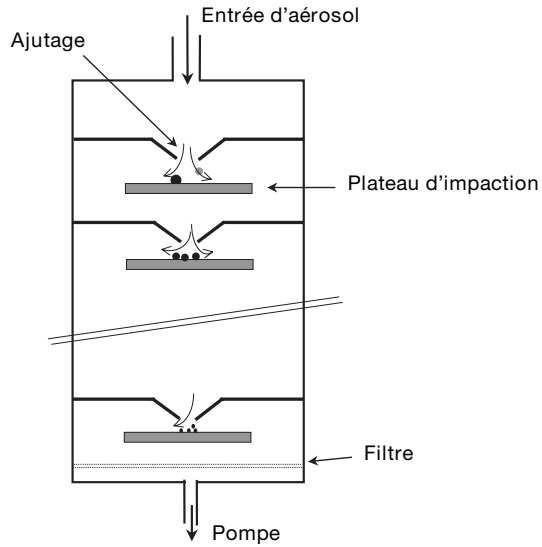


Figure 2.10. Schéma de principe d'un impacteur en cascade.

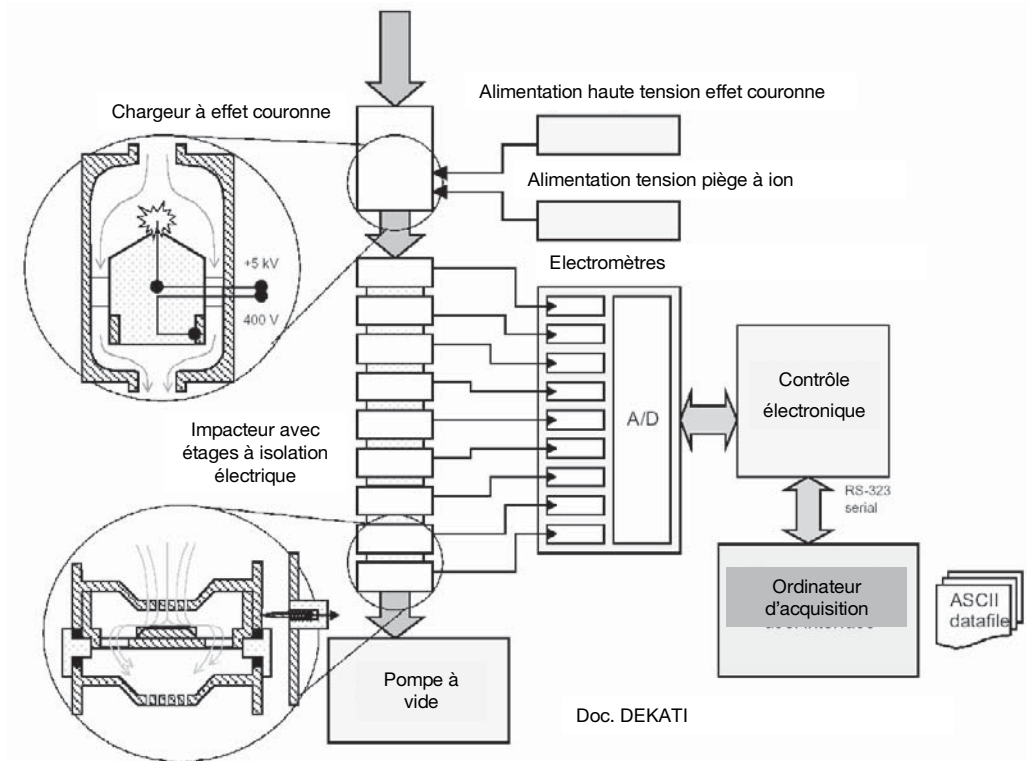


Figure 2.11. Schéma de principe de l'impacteur basse pression à détection électrique (ELPI).

| Mesure de la distribution en diamètre de mobilité électrique

La mesure de la granulométrie d'un aérosol ultra-fin est le plus souvent basée sur l'analyse de la mobilité électrique des particules. On charge électriquement l'aérosol à l'aide d'ions artificiellement créés dans le gaz par des chargeurs bipolaires (appelés également neutraliseurs) utilisant une source radioactive, ou par des chargeurs unipolaires utilisant un effet couronne.

La mobilité électrique d'une particule chargée correspond au rapport entre sa vitesse de dérive et la valeur du champ électrique qui la met en mouvement.

Les analyseurs de mobilité électrique permettent de sélectionner les particules de mobilité électrique déterminée, ensuite détectées par un compteur de noyaux de condensation ou par un électromètre (voir schéma de principe figure 2.12).

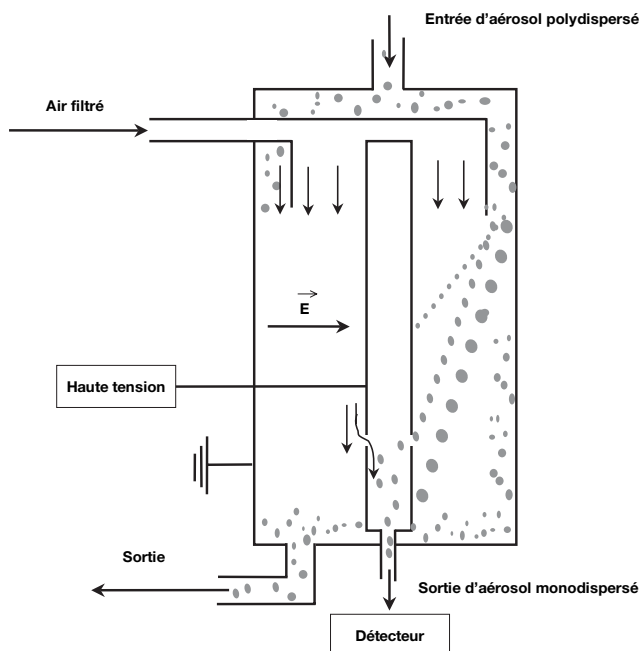


Figure 2.12. Schéma de principe de l'analyseur de mobilité électrique.

En faisant varier le champ électrique dans l'analyseur, on sélectionne successivement des particules de mobilités électriques différentes, ensuite détectées par exemple par un compteur de noyaux de condensation. On peut ainsi déterminer la distribution en mobilité électrique des particules. En connaissant la loi de charge électrique des particules et en utilisant la relation définissant la mobilité électrique d'une particule sphérique, on peut calculer la distribution granulométrique de l'aérosol en diamètre

équivalent de mobilité électrique. Lorsque le détecteur utilisé est un compteur de noyaux de condensation, la distribution obtenue est une distribution en nombre de particules.

Ces analyseurs permettent de sélectionner des particules de diamètre compris entre quelques nanomètres et 1 micromètre. Plusieurs types d'analyseurs présentent des géométries et des écoulements adaptés à la sélection des particules ultra-fines (minimisation de la diffusion brownienne).

Le système actuellement le plus utilisé pour mesurer la granulométrie des aérosols ultra-fins est le SMPS, (pour *Scanning Mobility Particle Sizer*). Ce système charge les particules avec des ions bipolaires créés par une source radioactive. Les particules sont sélectionnées dans l'analyseur par un champ électrique qui varie de façon monotone, et sont détectées par un compteur de noyaux de condensation. Ce système a une excellente résolution ; il peut comporter jusqu'à 256 canaux de mesure sur 3 décades de diamètre. Cependant, comme il ne comporte qu'un détecteur, l'analyse requiert au minimum un temps d'acquisition de 30 s ; il est nécessaire que l'aérosol soit stable pendant ce temps. Par ailleurs, ce système n'est pas adapté à la mesure d'aérosols faiblement concentrés, notamment pour les PUF. En effet, les particules détectées sont celles qui ont acquis une charge électrique positive, et elles ne représentent qu'une faible fraction de la population ; par exemple, pour des particules de 10 nm, la proportion de particules comportant une charge électrique positive est d'environ 5 % (Wiedensohler, 1988).

Des systèmes permettant de réaliser des mesures quasiment en temps réel ont été commercialisés. Ils reposent d'une part sur l'utilisation d'une batterie d'analyseurs et de détecteurs disposés en parallèle (Gerhart et Reishl, 2004), d'autre part sur un analyseur unique équipé de plusieurs détecteurs fonctionnant en parallèle (Tammet et coll. 1998).

| Mesure de la distribution en diamètre diffusional ou thermodynamique

La mesure du diamètre thermodynamique d'une particule repose sur la détermination de son coefficient de diffusion et le recours à la relation de Stokes-Einstein (voir équations 5 et 6).

Les particules entrant en contact avec une surface y adhèrent, contrairement aux molécules. En conséquence, il existe un gradient de concentration, lequel induit un flux de particules (première loi de Fick), fonction du coefficient de diffusion brownienne. Plus le diamètre des particules est petit, plus leur coefficient de diffusion est élevé, et plus le flux vers la surface et le dépôt sont importants. Cette propriété est mise à profit dans les batteries de diffusion pour déterminer le diamètre thermodynamique des particules à

partir de leur fraction pénétrante ; cette dernière peut être déduite de l'équation de convection-diffusion qui décrit les profils de concentration dans différentes géométries et pour différents écoulements.

Par exemple, pour un tube cylindrique, la fraction pénétrante (rapport entre la concentration aval et la concentration amont) s'exprime en fonction d'un paramètre ϕ défini par :

$$\phi = \frac{\pi \cdot D \cdot L}{Q}, \quad (18)$$

où L représente la longueur du tube (m) et Q le débit volumique dans le tube ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$).

Les particules sortant du tube ont un coefficient de diffusion inférieur à un coefficient critique défini par l'équation de la fraction pénétrante. En faisant passer un aérosol à travers des tubes de longueurs différentes disposés en parallèle, et en mesurant les fractions pénétrantes à travers chaque tube, on peut déterminer une distribution cumulée de coefficients de diffusion. Les fractions pénétrantes sont généralement mesurées à l'aide d'un compteur de noyaux de condensation. On peut ensuite calculer une distribution en diamètre thermodynamique en utilisant les relations 5 et 6.

De façon plus rigoureuse, il faut en fait considérer la probabilité de pénétration des particules à travers chaque tube plutôt qu'un diamètre critique de pénétration et procéder à une inversion des données pour restituer la distribution granulométrique de l'aérosol. Dans le cas des batteries de diffusion, cette étape est délicate du fait du recoupement des probabilités de pénétration de particules d'un même diamètre sur les différents canaux d'une batterie (Mercer et Greene, 1974).

Il existe différentes géométries de batteries de diffusion ; elles sont basées sur des tubes cylindriques ou rectangulaires, des canaux annulaires, des lits granulaires (Boulaud et Diouri, 1988) ou des grilles.

Les systèmes les plus répandus sont des batteries à grilles (Cheng et Yeh, 1980 ; schéma de principe figure 2.13). Dans ce système, la concentration de l'aérosol est mesurée avec un compteur de noyaux de condensation de façon successive après des étages constitués d'un nombre croissant de grilles métalliques. Ceci permet de mesurer la granulométrie pour des diamètres thermodynamiques compris entre 3 nm et 150 nm. Les mesures étant effectuées de façon successive sur les différents canaux, il faut que l'aérosol soit stable pendant la période de mesure pour obtenir une information représentative.

Plus récemment, Fierz et coll. (2002) ont proposé une batterie de diffusion à grilles permettant d'obtenir une granulométrie en temps réel. Pour cela, l'aérosol est préalablement chargé par des ions unipolaires créés par un effet couronne, et les particules chargées collectées sur les différents assemblages de grilles sont détectées en temps réel à l'aide d'électromètres.

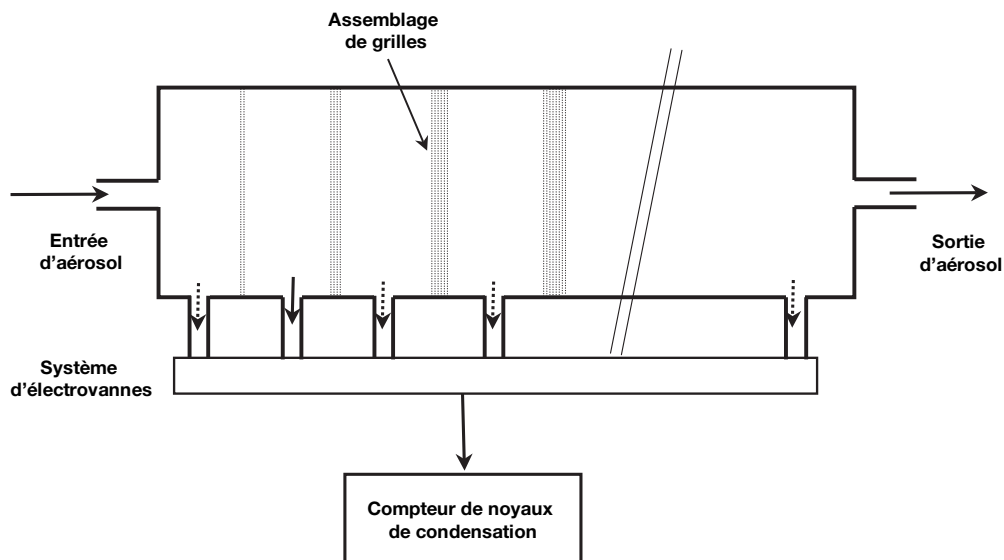


Figure 2.13. Schéma d'un système de mesure utilisant une batterie de diffusion à grille et un compteur de noyaux de condensation.

1.3. Éléments pour la caractérisation de l'exposition professionnelle

Pour évaluer l'exposition par inhalation, il est essentiel de caractériser les particules dispersées dans l'air, c'est-à-dire l'aérosol. Dans la pratique, l'évaluation du risque pour l'homme au travail s'effectue à partir de mesures de concentration en masse d'une substance dans l'air (exprimée, par exemple, en mg/m^3 ; INRS, 2005). Cela implique d'utiliser, dans la mesure du possible, des méthodes de mesures « individuelles », c'est-à-dire positionnées au plus près des voies respiratoires supérieures de l'individu (INRS, 2001). Enfin, l'évaluation de l'exposition implique l'échantillonnage d'une fraction spécifique de l'aérosol (inhalable, thoracique ou alvéolaire) définie suivant la norme NF EN 481 (AFNOR, 1993). En effet, l'ensemble des valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) est, en France et dans de nombreux pays, fondé sur la mesure d'une de ces fractions, en fonction de la nature des effets potentiels sur la santé (dans la grande majorité des cas, il s'agit des fractions inhalable ou alvéolaire). L'exposition professionnelle aux aérosols ne doit donc en général pas être évaluée sur la base des fractions PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$ ou autres similaires, qui sont propres aux problématiques environnementales ; de telles pratiques pourraient engendrer de délicats problèmes d'interprétation.

Comme précisé par la suite au chapitre 3 point 1, les courbes conventionnelles définissent une probabilité de pénétration des particules dans différents compartiments

respiratoires en fonction de leur diamètre aérodynamique. Or ce critère n'est pas pertinent pour les PUF, puisque cette approche peut conduire à sous-estimer l'exposition et donc le risque (Witschger et Fabriès, 2005). Il semble alors nécessaire de prendre en compte la fraction déposée des particules, c'est-à-dire d'évaluer la dose délivrée au poumon ; si cette approche est nouvelle en hygiène du travail, elle ne l'est pas en radioprotection.

Par ailleurs, plusieurs études montrent que, lorsque la taille des particules diminue, la toxicité des particules inhalées croît et la surface totale augmente (Maynard et Kuempel, 2005 ; Oberdörster et coll., 2005). Or les méthodes conventionnelles d'évaluation des expositions, comme la majorité des VLEP, sont basées sur la caractérisation de la masse et de la composition chimique des particules, indicateurs qui ne semblent pas totalement appropriés pour les PUF insolubles ou faiblement solubles (Tsuji et coll., 2006). L'approche actuelle d'évaluation de l'exposition professionnelle déployée pour les aérosols en général ne semble pas adaptée au cas des aérosols de PUF insolubles ou faiblement solubles. Cette remise en question étant récente et les moyens alloués jusqu'à maintenant aux recherches nécessaires en métrologie déficients, il n'existe pas de méthode alternative stabilisée en hygiène du travail. Par ailleurs, comme exposé au chapitre 3, point 3, il existe de nombreuses situations professionnelles dans lesquelles des expositions aux PUF sont possibles et pour lesquelles le niveau de connaissance est proche de zéro. On peut donc dire que, pour ces situations, le niveau de risque pour la santé n'est quasiment pas évalué et que, par voie de conséquence, l'approche préventive est sans doute inadaptée.

Théoriquement, tout mesurage d'exposition professionnelle doit produire un résultat qui puisse être interprété sans ambiguïté en termes de niveau de risque pour la santé. La question « comment mesure-t-on l'exposition aux particules ultra-fines ? » renvoie inévitablement à la suivante : « quels sont les paramètres à mesurer qui soient pertinents pour évaluer les effets sur la santé ? ». Il n'y a à ce jour aucune certitude pour mesurer un paramètre (concentration en masse, en nombre, en surface, forme des particules...) plutôt qu'un autre, en plus de la composition et de la structure, même si les résultats convergent pour dire que la masse n'est pas adaptée (Tsuji et coll., 2006). Tant que la communauté scientifique n'aura pas pu, ou su, déterminer les indicateurs à mesurer, l'évaluation du risque professionnel ne pourra être menée de façon incontestable et pragmatique. Pour le moment, la seule approche pertinente est d'utiliser différents instruments de manière à caractériser au mieux les PUF, dans l'objectif que ces données puissent être utiles dans un futur proche. Cela signifie concrètement de déterminer les concentrations en surface, en nombre et en masse, mais également les distributions granulométriques, la forme des particules, la composition chimique, la structure cristalline, etc. Ceci n'est pas simple car impliquant différentes techniques ou méthodes (et donc probablement la pluridisciplinarité), dont certaines sont complexes et coûteuses, voire non validées. De plus, les performances des instruments de métrologie des PUF ne sont pas très bien connues et nécessiteraient d'être étudiées en situations réelles pour divers paramètres.

Le tableau ci-après (tableau 2.III) résume les commentaires et questionnements relatifs aux indicateurs que sont le nombre, la masse, la surface, la taille et la forme des particules.

Indicateur	Commentaires/Questionnements
Nombre	La mesure est relativement simple à effectuer (avec le bon type de compteur). La mesure est-elle pertinente pour évaluer les effets sur la santé ? Difficulté liée au bruit de fond en particules de l'air ambiant.
Masse	Mesure nécessaire pour assurer une continuité des évaluations professionnelles. Mesure <i>a priori</i> non pertinente vis-à-vis des effets des PUF sur la santé. Difficultés liées à la sélection granulométrique et à la sensibilité des analyses sur les prélèvements (gravimétrie, analyses chimiques).
Surface	Mesure qui semble pertinente vis-à-vis des effets. L'instrumentation répond-elle aux besoins ? La mesure de référence (surface BET) n'est pas adaptée aux aérosols.
Taille	Mesure informative et <i>a priori</i> pertinente. Quel diamètre mesurer ? L'instrumentation est complexe et les résultats difficiles à interpréter.
Forme	Mesure informative, mais est-elle pertinente ? Comment caractériser la forme des particules ? Il n'existe pas de méthode stabilisée.

Tableau 2.III. Commentaires et questionnements relatifs à différents paramètres de caractérisation des particules d'aérosols.

Dans les atmosphères de travail, du fait des modes de formation des aérosols ultra-fins, les événements à l'origine de l'émission de PUF sont, dans la plupart des situations, fugitifs ou instables. Cela induit une variabilité spatio-temporelle plus ou moins importante des concentrations ou de la granulométrie. Dans certains environnements, des conditions d'émissions multiples couplées à des mouvements d'air naturels ou forcés, peuvent être rencontrés et renforcer cette variabilité. De plus, les opérateurs sont eux-mêmes souvent mobiles. C'est pourquoi des données obtenues à point fixe ne peuvent être directement transposées en données d'exposition. La stratégie de mesurage est un point clé de la caractérisation des aérosols ultra-fins en atmosphère de travail (Brouwer et coll., 2004).

Le tableau 2.IV résume les éléments principaux à considérer. Un premier est la sélection du (ou des) point(s) où vont être réalisées les mesures. Il est indispensable d'identifier la source des PUF que l'on cherche à caractériser. Dans le cas où plusieurs sources

existent, il convient d'évaluer leurs interférences avec celle visée par l'étude. La contribution éventuelle des sources parasites extérieures (PUF pénétrant dans le local depuis l'extérieur, émission de véhicules...) doit être évaluée. L'aérosol « bruit de fond », c'est-à-dire en l'absence totale de particules liées à l'activité étudiée, doit être mesuré ; ce point est encore plus important si la mesure est fondée sur le comptage des particules. Des outils de détection comme des compteurs de PUF peuvent s'avérer utiles, à condition de bien connaître les limites propres à chaque appareil.

Un deuxième point concerne l'aéraulique (transfert des PUF dans l'air), qui va permettre de comprendre l'origine des variations spatio-temporelles. La visualisation des écoulements est un outil intéressant, mais les générateurs de fumées sont à proscrire puisque ce sont des émetteurs de PUF... Les vecteurs vitesse de l'air (direction et amplitude) peuvent être déterminés à l'aide d'anémomètres. Pour des locaux à grands volumes, des techniques plus lourdes comme le traçage gazeux sont mises en œuvre ; ces dernières ne donnent toutefois qu'une information globale du transfert entre deux points, ou bien du taux de renouvellement de l'air, sans information précise sur les vitesses ni sur les directions des écoulements.

Sujet	But	Outils
Source	Identifier et localiser la (les) source(s) d'aérosol(s) ultrafin(s) dans l'environnement de travail ; identifier la pénétration de l'aérosol ambiant extérieur pour sélectionner les points de mesurage	Compteurs de particules (CNC) ou autres appareils à mesure directe sensibles aux PUF Observation et enregistrement des activités émettrices qui pourraient venir modifier l'aérosol au voisinage de la source de contamination étudiée
Aéraulique	Connaître les mouvements d'air et le transfert des aérosols dans l'atmosphère de travail	Anémomètre Gaz traceur Observation et enregistrement des événements (ouvertures de portes...)
Activités	Interpréter les données des instruments de mesure en temps réel en termes de variations des paramètres d'exposition	Compteurs de particules (CNC) ou autres appareils à mesure directe sensibles aux PUF Observation et enregistrement des activités émettrices
Position opérateur	Interpréter les différences spatiales en termes de temps de résidence en différents points fixes	Observation et enregistrement du positionnement de l'opérateur par rapport à la source/point de mesure

Tableau 2.IV. Éléments de stratégie à considérer.

Conclusion

De même que la recherche sur la toxicité des particules nanostructurées doit se poursuivre, l'étude de l'instrumentation existante et le développement d'une nouvelle instrumentation, plus simple, et la mise au point de nouvelles méthodes adaptées à la caractérisation de l'exposition aux PUF sont essentiels au fondement d'une juste évaluation et maîtrise des risques.

Aucune technique de mesure actuelle ne permet une caractérisation « idéale » – à supposer que l'on soit capable de la définir – des aérosols ultra-fins issus d'un procédé dans une atmosphère de travail. Chacune fournit une information utile sur un aspect ou un autre : le plus indiqué à ce jour est donc de combiner différentes techniques (Tsuji et coll., 2006 ; Witschger et Fabriès, 2005). Cependant, les différences dans les principes de mesurage introduisent des difficultés d'interprétation ; il en résulte que les outils restent du domaine des spécialistes, notamment de la métrologie des aérosols. La caractérisation de l'exposition professionnelle aux PUF est un travail de longue haleine qui nécessite des moyens (humains et métrologiques) suffisants. Force est de constater au regard des publications scientifiques internationales que les équipes travaillant sur le sujet sont extrêmement réduites.

Bibliographie

- AFNOR (1993). Atmosphères des lieux de travail. Définitions des fractions de taille pour le mesurage des particules en suspension dans l'air. NF EN 481 (X43-276), Paris, AFNOR, novembre 1993, 16 pages.
- Baltensperger U, Weingartner E, Burtscher H, Keskinen J (2001). Dynamic mass and surface area measurements, In *Aerosol Measurement, Principles Techniques and Applications*. 2nd ed, Baron et Willeke, Wiley & Sons.
- Baron PA, Willeke (2001). Gas and particle motion, In *Aerosol Measurement, Principles Techniques and Applications*. 2nd ed, Baron et Willeke, Wiley & Sons.
- Baron PA, Sorensen CM, Brockmann JE (2001). Nonspherical particle measurement: shape factors, fractals and fibers. In *Aerosol Measurement, Principles Techniques and Applications*. 2nd ed, Baron et Willeke, Wiley & Sons.
- Boulaud D, Diouri M (1988). A new inertial and diffusional device (SDI 2000). *J Aerosol Sci* **19**, 927-931.
- Brasil AM, Farias TL, Carvalho MG (1999). A recipe for image characterization of fractal-like aggregates. *J Aerosol Sci* **30**, 1379-1389.
- Bricard J (1977a). Physique des aérosols 1^{re} partie. Rapport CEA-R-4831(2).
- Bricard J (1977b). Physique des aérosols 2^e partie. Rapport CEA-R-4831(2).
- Brouwer DH, Gijsbers JHJ, Lurvink MWM (2004). Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies. *Ann Occup Hyg* **48**, 439-453.

- Brunauer S, Emmet PH, Teller E (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc* **60**, 309-319.
- Chakrabarti B, Singh M, Sioutas C (2004). Development of a near-continuous monitor for measurement of the sub-150nm PM mass concentration. *Aerosol Sci Technol* **38**(S1), 239-252.
- Cheng Y.S, Yeh H.C (1980). Theory of a screen-type diffusion battery. *J Aerosol Sci* **11**, 313-320.
- DeCarlo P.F, Slowik JG, Worsnop DR, Davidovits P, Jimenez JL (2004). Particle morphology and density characterization by combined mobility and aerodynamic diameter measurements. Part 1: Theory. *Aerosol Sci Technol* **38**, 1185-1205.
- Fierz M, Scherrer L, Burtscher H (2002). Real time measurement of aerosol size distributions with an electrical diffusion battery. *J Aerosol Sci* **33**, 1049-1060.
- Friedlander SK (2000). *Smoke, Dust and Haze Fundamentals of Aerosol Dynamics*. 2nd Ed, Oxford University Press.
- Fuchs NA (1964). *The mechanics of Aerosols*. Ed. by Pergamond Press, Oxford.
- Gäggeler HW, Baltensperger U, Emmenegger M, Jost DT, Schmidt-Ott A, Haller P, Hofmann M (1989). The epiphaniometer, a new device for continuous aerosol monitoring. *J Aerosol Sci* **20**, 557-564.
- Gerhart C, Reischl GP (2004). Concept and experiences of a fast measuring aerosol spectrometer for the range from 5 to 600 nm – GRIMM TR-DMPS 5.600. Actes du Congrès Français sur les Aérosols, Paris décembre 2004. 75-80.
- Gussman RA, Kenny LC, Labickas M, Norton P (2002). Design, Calibration, and Field Test of a Cyclone for PM₁ Ambient Air Sampling. *Aerosol Sci Technol* **36**, 361-366.
- Han HS, Singh M, Osmondson B, Krinke T (2005). A novel instrument for measuring surface area of particles deposited in different regions of the lung. 2nd International Symposium on Nanotechnology and Occupational Health, 3-6 October, 2005, Minneapolis, MN. Proceedings, p. 68.
- Hinds WC (1999). *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles*. 2nd ed, Wiley & Sons.
- INRS (2001). Échantillonnage des aérosols. Généralités. Fiche Métropol H1, 12 pages.
- INRS (2005). Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France. ND 2098, 19 pages.
- Julien R, Botet R (1987). *Aggregation and fractal aggregates*. World Scientific Publishing.
- Jung H, Kittelson DB (2005). Characterization of aerosol surface instruments in transition regime. *Aerosol Sci Technol* **39**, 902-911.
- Kasper M, Matter U, Burtscher H (2000). NanoMet: On-line characterization of nanoparticle size and composition. SAE Paper, 2000-01-1998, pp. 27-38.
- Kasper M, Matter U, Burtscher H, Bukowiecki N, Mayer A (2001). NanoMet: a new instrument for on-line size and substance specific particle emission analysis. SAE Paper, 2001-01-0216, pp. 79-88.
- Keller A, Fierz M, Siegmänn K, Siegmänn HC (2001). Surface science with nanosized particles in a carrier gas. *J Vac Sci Technol* **A19**, Jan/Feb, 1-9.

- Keskinen J, Pietarinen K, Lehtimäki M (1992). Electrical low pressure impactor. *J Aerosol Sci* **23**, 353-360.
- Kim H, Lee KW, Lee SJ (2002). Design and experimental characterization of low-volume PM10/2.5/1.0 trichotomous sampler inlet. *Part Part Syst Charact* **19**, 387-390.
- Koylu UO, Faeth GM, Farias TL, Carvalho MG (1995). Fractal and projected structure properties of soot aggregates. *Combust Flame* **100**, 621-633.
- Kütz S, Schmidt-Ott A. (1990). Use of a low-pressure impactor for fractal analysis of submicron particles. *J Aerosol Sci* **21-S1**, S47-S50.
- Matter Engineering (2002). Diffusion Charging Particle Sensor Type LQ1-DC. Matter Engineering AG, CH 5610 Wohlen, 4pages.
- Maynard AD, Kuempel ED (2005). Airborne nanostructured particle and occupational health. *J Nanopart Res* **7**, 587-614.
- McMurry PH (2000). A review of atmospheric aerosol measurements. *Atmos Environ* **34**, 1959-1999.
- Mercer TT, Greene TD (1974). Interpretation of diffusion battery data. *J Aerosol Sci* **5**, 251-255.
- Nyeki S, Colbeck I (1994). The measurement of the fractal dimension of individual in-situ soot agglomerates using a modified Millikan cell technique. *J Aerosol Sci* **25**, 75-90.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **102**, 173-179.
- Oh C, Sorensen CM (1997). Light scattering study of fractal cluster aggregation near the free molecular regime. *J Aerosol Sci* **28**, 937-957.
- Ouf FX (2006). Caractérisation des aérosols émis lors d'un incendie. Thèse de l'Université de Rouen.
- Pandis SN, Baltensperger U, Wolfenbarger JK, Seinfeld JH (1991). Inversion of aerosol data from the epiphaniometer. *J Aerosol Sci* **22**, 417-428.
- Park K, Kittelson DB, McMurry PH (2004). Structural properties of diesel exhaust particles measured by transmission electron microscopy (TEM): relationships to particle mass and mobility. *Aerosol Sci Technol* **38**, 881-889.
- Renoux A, Boulaud D (1998). *Les aérosols : Physique et Métrologie*. Ed. Lavoisier, Technique & documentation.
- Rogak SN, Baltensperger U, Flagan R.C (1991). Measurement of mass transfer to agglomerate aerosols. *Aerosol Sci Technol* **14**, 447-458.
- Rogak SN, Flagan RC (1990). Stokes drag on self-similar clusters of spheres. *J Colloid Interf Sci* **123**, 206-218.
- Rogak SN, Flagan RC (1992). Bipolar diffusion charging of spheres and agglomerate aerosol-particles. *J Aerosol Sci* **23**, 693-710.
- Rouquerol F, Luciani L, Llewellyn P, Denoyel R, Rouquerol J (2003). Texture des matériaux pulvérulents ou poreux. *Techniques de l'ingénieur, analyse et caractérisation*. **P1050**.
- Samson RJ, Mulholland GW, Gentry JW (1987). Structural analysis of soot agglomerates. *Langmuir* **3**, 272-281.
- Schmidt-Ott A, Baltensperger U, Gäggeler HW, Jost DT (1990). Scaling behaviour of physical parameters describing agglomerates. *J Aerosol Sci* **21**, 711-717.

- Sioutas C, Chang MC, Kim S, Koutrakis P, Fergusson ST (1999). Design and experimental characterization of a PM₁ and a PM_{2.5} personal sampler. *J Aerosol Sci* **30**, 693-707.
- Skillas G, Kunxel S, Burtscher H, Baltensperger U, Siegmann K (1998). High fractal-like dimension of diesel soot agglomerates *J Aerosol Sci* **29**, 411-419.
- Sorensen CM (1997). Scattering and absorption of light by particles and aggregates. Handbook of surface and colloid chemistry. Edited by K.S. Birdi, CRC Press.
- Sorensen CM (2001). Light scattering by fractal aggregates: a review. *Aerosol Sci Technol* **35**, 648-687.
- Tammet H, Mirme A, Tamm E (1998). Electrical Aerosol Spectrometer of Tartu University. *J Aerosol Sci* **29** (suppl. 1), s427-s428.
- TSI (2004). Electrical Aerosol Detector Model 3070A. Specification sheet. TSI Inc., Shoreview, MN, 3 pages.
- Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit D, Santamaria AB (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part IV: Risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci* **89**, 42-50.
- Van Gulijk C, Marijnissen JCM, Makkee M, Moulijn JA, Schmidt-Ott A (2004). Measuring diesel soot with a scanning mobility particle sizer and electrical low-pressure impactor: performance assessment with a model for fractal-like agglomerates. *J Aerosol Sci* **35**, 633-655.
- Weber AP, Baltensperger U, Gaggeler HW, Schmidt-Ott A (1996). In situ characterization and structure modification of agglomerated aerosol particles. *J Aerosol Sci* **27**, 915-929.
- Weber RJ, Stolzenburg MR, Pandis SN, McMurry PH (1998). Inversion of ultrafine condensation nucleus counter pulse height distributions to obtain nanoparticle (~3-10 nm). size distributions. *J Aerosol Sci* **29**, 601-615.
- Wiedensohler A (1988). An approximation of the bipolar charge distribution for particles in the submicron size range. *J Aerosol Sci* **19**, 387-389.
- Witschger O, Fabriès JF (2005). Particules ultra-fines et santé au travail. 1 – Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. Hygiène et sécurité au travail, ND 2227, 199, pp. 21-35.
- Witschger O, Fabriès JF (2005). Particules ultra-fines et santé au travail. 2 – Sources et caractérisation de l'exposition. Hygiène et sécurité au travail, ND 2228, 199, pp. 21-35.
- Witten TA, Sander LM (1981). Diffusion-limited aggregation, a kinetic critical phenomenon. *Phys Rev Lett* **47**, 1400-1403.
- Xiong C, Friedlander SK (2001). Morphological properties of atmospheric aerosol aggregates. *Proceed Nat Acad Sci Unit States America* **98**, 11851-11856.

2. Aérosols ultra-fins dans l'environnement

F. Gensdarmes

Introduction

Le développement des connaissances sur les aérosols est fortement lié à l'histoire des sciences de l'atmosphère. D'après Podzimeck (1985, 1989), c'est en 1847 que H. Becquerel fit l'hypothèse de l'existence de particules ultra-fines (PUF) dans l'air, encore appelées noyaux de condensation. Cette existence est confirmée par les expériences de Coulier (1875) sur la détente adiabatique de l'air. Il observe, avec son appareil à détente, une condensation plus facile de la vapeur d'eau avec de l'air non filtré qu'avec de l'air filtré. Cet appareil peut donc être considéré comme le premier détecteur de noyaux de condensation. À la même époque, Aitken (1880, 1888) travaille sur la détection et la caractérisation des PUF en suspension dans l'air.

Depuis plus de 100 ans, beaucoup de recherches ont été conduites sur les aérosols et la pollution atmosphérique particulaire (Preining et Davis, 2000). Ces recherches sont activement poursuivies dans le domaine de l'environnement pour comprendre le rôle des aérosols et notamment des PUF sur le climat, la chimie de l'atmosphère et la santé des populations.

L'aérosol atmosphérique est composé d'un mélange de particules solide et liquide en suspension dans l'air, d'origines naturelle ou anthropique (principalement en milieux urbains). Il joue un rôle complexe et non négligeable dans le bilan radiatif de l'atmosphère, car il absorbe et diffuse les rayonnements solaire et infrarouge. Il a également des effets indirects *via* la formation des nuages et des pluies.

Les particules présentes dans l'atmosphère sont formées par différents mécanismes : réactions chimiques en phase gazeuse, condensation, coagulation, mise en suspension éolienne, éclatement des bulles à la surface des océans, volcanisme, feux et activités humaines. En conséquence, la distribution granulométrique est complexe et très variable dans le temps et l'espace (Hinds, 1999). Cette distribution couvre une plage de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de micromètres.

2.1. Sources de particules dans l'atmosphère

Pour une meilleure compréhension du rôle de l'aérosol atmosphérique, il est nécessaire de bien connaître les différentes sources et les mécanismes de production des particules. Dans ce cadre, on distingue les sources primaires et les sources secondaires ; les aérosols primaires incluent la poussière volcanique, les matériaux organiques issus des feux de biomasse, les suies de combustion et la poussière minérale provenant de processus éoliens. Les aérosols secondaires incluent les sulfates provenant de l'oxydation des gaz

soufrés, les nitrates provenant des espèces gazeuses azotées et les produits d'oxydation de composés organiques volatils (COV).

Les données globales sur les différentes sources de particules dans l'atmosphère présentées ici, les plus récentes disponibles, sont extraites du rapport d'un groupe de travail international sur les changements climatiques (IPCC, 2001). D'Almeida (1991), Andreae (1995) et Raes et coll. (2000) présentent également des inventaires détaillés des émissions globales d'aérosols dans l'atmosphère.

2.1.1. Sources primaires d'aérosol

Le tableau 2.V présente une synthèse des différentes sources primaires d'aérosols. Dans ce tableau, pour les particules à base de carbone, on distingue le « black carbon » et la matière organique. Cette distinction s'effectue sur la base des propriétés d'absorption importante des rayonnements par le « black carbon ». Le tableau 2.V indique les estimations des quantités totales de particules émises à la surface du globe ainsi que la gamme de variation des valeurs rencontrées dans différentes études (IPCC, 2001).

Type d'aérosol	Estimation de la quantité globale émise ($\times 10^6$ t/an)	Gamme des valeurs rencontrées dans la littérature ($\times 10^6$ t/an)
• Particules à base de carbone		
- Matière organique ($< 2 \mu\text{m}$)		
Combustion de la biomasse	54	45 - 80
Combustion de carburants fossiles	28	10 - 30
Origine biologique	56	0 - 90
- Black carbon (suie, charbon) ($< 2 \mu\text{m}$)		
Combustion de la biomasse	5,7	5 - 9
Combustion de carburants fossiles	6,6	6 - 8
• Particules d'origine industrielle hors combustion ($> 1 \mu\text{m}$)	100	40 - 130
• Particules de sels marins ($< 1 \mu\text{m}$)	54	18 - 100
• Particules de sels marins ($1 - 16 \mu\text{m}$)	3 290	1 000 - 6 000
• Particules d'origine minérale : sol, volcan ($< 1 \mu\text{m}$)	110	
• Particules d'origine minérale : sol, volcan ($< 20 \mu\text{m}$)	2 150	1 000 - 3 000

Tableau 2.V. Synthèse des sources primaires d'aérosol pour l'année 2000 (IPCC, 2001).

Ce tableau montre que, globalement, la principale source primaire de particules dans l'atmosphère est l'aérosol marin, produit en grande quantité, en particulier lors de la formation des embruns sous l'action du vent et l'éclatement des bulles à la surface de la mer (encore appelé pétilllement des océans ; Monahan et coll. 1986). Ces particules ont une distribution granulométrique très étendue avec des diamètres compris entre 0,05 μm et 10 μm (Andreas 1998, Andreas et coll. 2001, Piazzola et coll. 2002).

Les particules d'origine minérale représentent également une composante importante de l'aérosol atmosphérique. Ces particules proviennent essentiellement de l'érosion des sols, de l'action éolienne sur les déserts ; leur distribution granulométrique en masse présente un diamètre aérodynamique médian supérieur à 1 μm .

Les particules d'origine industrielle proviennent de carrières, des procédés de fabrication du ciment, de l'industrie métallurgique, etc. mais également de la combustion de carburants fossiles. Les particules à base de carbone sont principalement issues de combustion, elles ont une distribution granulométrique très étendue, comprise entre quelques dizaines de nanomètres et plusieurs micromètres.

2.1.2. Sources secondaires d'aérosols

Le tableau 2.VI présente une synthèse des sources secondaires d'aérosols dans l'atmosphère (IPCC, 2001). Elles correspondent principalement à des PUF formées par nucléation à partir de réactions photochimiques dans l'atmosphère avec des précurseurs gazeux. Ces PUF évoluent en tailles, notamment par condensation et coagulation (voir figure 2.14, en 2.2, ci-après).

Type d'aérosol	Estimation de la quantité globale émise ($\times 10^6$ t/an)	Gamme des valeurs rencontrées dans la littérature ($\times 10^6$ t/an)
• Particules à base de sulfate		
- Origines humaine, biologique	179	97 - 332
- Origine volcanique	21	9 - 48
• Particules à base de nitrate		
- Origine humaine	14,2	9,6 - 19,2
- Origine naturelle	3,9	1,9 - 7,6
• Particules à base de composés organiques volatils	16	8 - 40

Tableau 2.VI. Synthèse des sources secondaires d'aérosols (IPCC, 2001).

Les principaux précurseurs des particules à base de sulfate sont le dioxyde de soufre (SO_2), provenant des activités humaines (notamment la combustion de carburants fossiles) et volcaniques, et le sulfure de diméthyle (DMS) provenant de sources biologiques comme le plancton marin. Dans le cas du SO_2 , des réactions d'oxydation photochimique produisent, en présence de vapeur d'eau et de rayonnement, des vapeurs d'acide sulfurique. Cette vapeur d'acide a une faible pression de vapeur saturante à température ambiante, de l'ordre de 10^{-2} Pa, ce qui permet d'atteindre des sursaturations élevées et ainsi la formation de nanoparticules par nucléation homogène. La formation de particules par réactions en phase gazeuse du SO_2 a été étudiée pour comprendre la formation de l'aérosol atmosphérique, notamment par Boulaud (1977).

Une synthèse a été réalisée par Kulmala et coll. (2004) sur les mesures de taux de production et de vitesse de grossissement des PUF formées par nucléation dans l'atmosphère. Pour les particules de 3 nm, les taux de production sont généralement compris entre $10^{-2} \text{ cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ et $10 \text{ cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ dans la couche limite atmosphérique. Dans les zones urbaines, les taux de production peuvent atteindre $10^2 \text{ cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$. Les taux de production les plus élevés, se situant entre $10^4 \text{ cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ et $10^5 \text{ cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$, sont rencontrés dans les zones maritimes et les panaches d'émissions industrielles. Les vitesses de grossissement de ces particules sont typiquement comprises entre $1 \text{ nm} \cdot \text{h}^{-1}$ et $20 \text{ nm} \cdot \text{h}^{-1}$ pour les latitudes moyennes, et dépendent de la température et de la présence de vapeurs condensables. Cette synthèse montre également la difficulté d'étudier la formation des particules par nucléation dans l'atmosphère du fait des limitations des instruments permettant de détecter et de mesurer la taille de ces particules.

2.2. Granulométrie de l'aérosol atmosphérique

Les particules de l'aérosol atmosphérique couvrent une gamme de taille très étendue (on parle d'aérosol polydispersé), typiquement de quelques nanomètres jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres. La distribution granulométrique peut être présentée en termes de nombre de particules par unité de volume d'air, de surface ou de masse. Une synthèse des méthodes de mesure de la granulométrie de l'aérosol atmosphérique a été réalisée par McMurry (2000). Dans la suite ne sont exposées que les caractéristiques générales des aérosols des basses couches de la troposphère.

La figure 2.14 représente les principaux processus de production des aérosols dans l'atmosphère ainsi que les mécanismes d'évolution de la taille des particules. L'ensemble des phénomènes conduit généralement à la présence de trois « modes » caractéristiques : le mode nucléation, le mode accumulation et le mode grosses particules. La figure 2.14 présente également les granulométries typiques de l'aérosol atmosphérique exprimées par rapport au nombre, à la surface et à la masse des particules (Whitby, 1978 ; Hidy, 1984) ; cette représentation fait comprendre que la

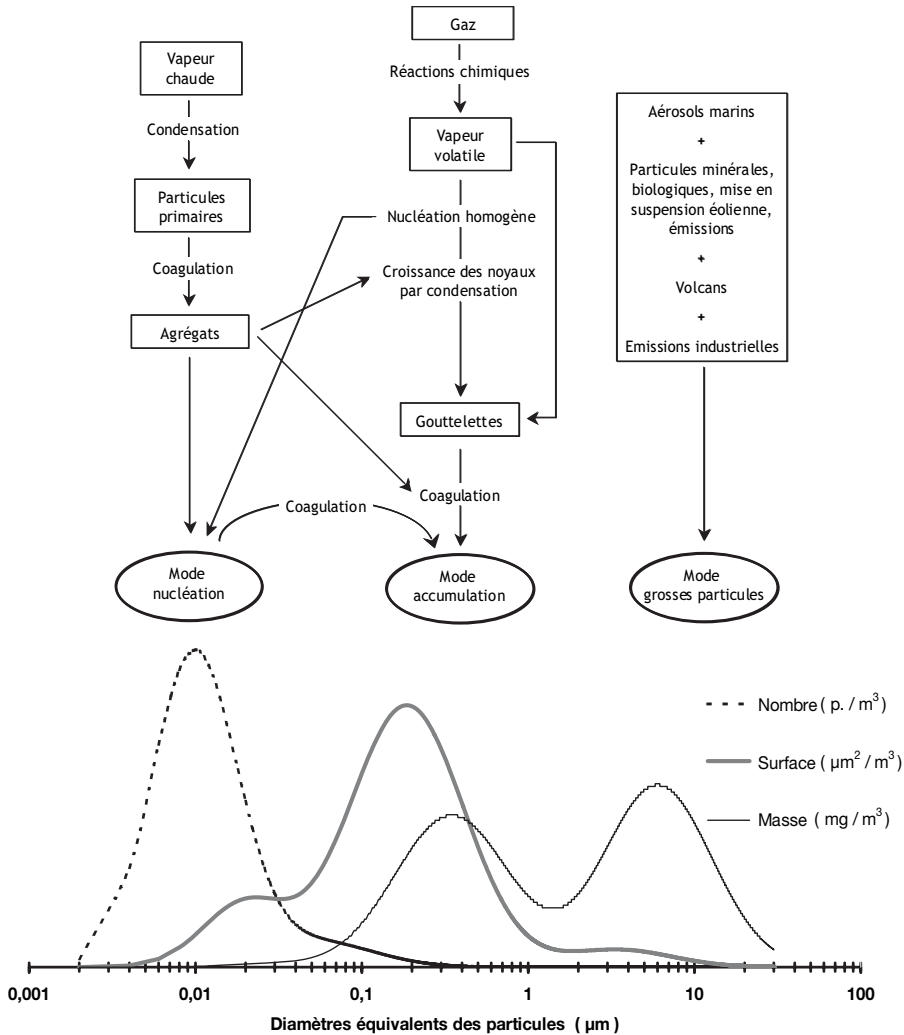


Figure 2.14. Schéma des mécanismes de production des particules dans l'atmosphère et des distributions granulométriques typiques en nombre, surface et masse.

prépondérance d'un mode par rapport à un autre dépend du choix du paramètre de base : nombre, surface ou masse.

D'une façon générale, le mode grosses particules résulte de processus mécaniques comme la mise en suspension de la poussière du sol par le frottement du vent, l'aérosol marin, les microgouttelettes des nuages et les particules biologiques. Ces particules constituent la majeure partie de la concentration massique de l'aérosol atmosphérique. Pour les diamètres inférieurs à $1 \mu m$, on parle généralement de particules fines. Dans ce

domaine, il existe un certain nombre de sous-classes : le mode nucléation, le mode d'Aitken et le mode accumulation (Renoux et Boulaud, 1998).

Le mode nucléation inclut les particules qui sont formées directement par nucléation homogène de la phase gaz/vapeur. Ce sont des particules fraîchement émises, par exemple à partir de sources de combustion. Ces particules ont des tailles allant du nanomètre jusqu'à 20 nm à 30 nm suivant les auteurs (McMurry, 2000).

Le mode d'Aitken est constitué de particules qui ont vieilli et se sont développées légèrement, par exemple par agrégation. Elles ont des dimensions de plusieurs dizaines de nanomètres (de 20 nm à 90 nm ; Kulmala et coll., 2004). Les modes de nucléation et d'Aitken dominent la distribution en nombre. Compte tenu de la dimension des particules du mode d'Aitken, il est souvent confondu dans le mode accumulation.

Le mode accumulation est composé de particules plus âgées qui se sont développées, notamment par coagulation, jusqu'à une taille au-delà de laquelle cette croissance ralentit nettement. Pour cette raison, et parce que les mécanismes de dépôt sont peu efficaces pour ces diamètres, les particules s'accumulent dans cette gamme. Le mode accumulation est composé de particules de diamètres allant de 100 nm à quelques centaines de nanomètres. C'est ce mode qui prédomine dans la représentation de distribution en surface de l'aérosol atmosphérique.

Le tableau 2.VII présente les ordres de grandeur des concentrations massique et numérique des aérosols atmosphériques rencontrés dans différents environnements (Hidy, 1984 ; Renoux et Boulaud, 1998 ; Hinds, 1999).

	Particules ultra-fines (< 0,1 µm) et mode accumulation (0,1 - 1 µm)	Grosses particules (> 1 µm)
Zone urbaine		
Nombre (cm ⁻³)	10 ⁴ - 10 ⁵ , localement 10 ⁶	10 - 100
Masse (µg·m ⁻³)	50 - 100	50 - 100
Zone continentale		
Nombre (cm ⁻³)	10 ³ - 10 ⁴	
Masse (µg·m ⁻³)	25	25
Zone maritime calme		
Nombre (cm ⁻³)	10 ³ - 10 ⁴	
Masse (µg·m ⁻³)	1	1 - 30

Tableau 2.VII. Concentrations typiques des aérosols rencontrés dans la basse atmosphère.

2.3. Évolution de l'aérosol atmosphérique

2.3.1. Temps de séjour des particules dans l'atmosphère

Les temps de séjour des particules dans l'atmosphère, très variables, dépendent notamment de leur diamètre, mais également des conditions météorologiques et de la topographie du terrain. Dans la troposphère, ce temps peut varier de quelques minutes à plusieurs dizaines de jours. Hidy (1984) en a présenté une synthèse.

Les temps de séjour les plus longs sont rencontrés pour des particules ayant des dimensions comprises entre $0,1\ \mu\text{m}$ et $1\ \mu\text{m}$, typiquement de quelques jours à quelques dizaines de jour. L'étude de Esmen et Corn (1971) indique des temps de séjour, en atmosphère urbaine et par temps sec, compris entre 4 et 40 jours pour les particules submicroniques. L'étude de Marley et coll. (2000) mesure des temps de séjour compris entre 33 et 66 jours pour des particules inférieures à $2\ \mu\text{m}$; ces données concernent différents sites d'Amérique du Nord pour la période printemps-été. Dans une étude expérimentale, Papastefanou (2006) détermine un temps de résidence moyen de 8 jours pour des particules de diamètres aérodynamiques compris entre $0,28\ \mu\text{m}$ et $1,18\ \mu\text{m}$. Cette valeur est une moyenne intégrant des conditions atmosphériques de temps sec et de pluie. Le temps de séjour moyen est déterminé par des mesures comparatives de différents radioéléments fixés sur les particules du mode accumulation de l'aérosol atmosphérique, notamment les descendants à vie longue du radon (^{210}Pb , ^{210}Bi et ^{210}Po) et le ^7Be produit dans l'atmosphère par les rayons cosmiques.

Les PUF et les grosses particules ont des temps de séjour beaucoup plus faibles, typiquement entre quelques minutes et quelques dizaines d'heures. Esmen et Corn (1971) indiquent des temps compris entre 10 heures et 4 jours pour des particules de diamètres aérodynamiques compris entre $1\ \mu\text{m}$ et $10\ \mu\text{m}$. Pour les nanoparticules, le terme « temps de séjour » peut être inapproprié. En effet, lorsque l'on considère l'évolution rapide des nanoparticules par coagulation et attachement sur les particules du mode accumulation, il est préférable de parler de « temps de vie », car elles restent en suspension, mais sous une autre forme. En revanche, si l'on considère le dépôt des nanoparticules par diffusion brownienne sur les surfaces autres que celle présentée par l'aérosol ambiant, le terme « temps de séjour » conserve son sens initial. Harrison (1996) indique un temps caractéristique de séjour d'environ 15 minutes pour des particules de 10 nm.

2.3.2. Mécanismes de dépôt

Pour déterminer l'impact de la pollution par les aérosols sur les bâtiments et les écosystèmes, il est nécessaire d'étudier les mécanismes de dépôt des particules. Ces derniers permettent également de comprendre, en partie, l'évolution de l'aérosol atmosphérique.

Il existe deux processus de dépôt : le dépôt sec et le dépôt humide (en cas de précipitations). Chacun de ces processus fait intervenir plusieurs mécanismes physiques : la diffusion brownienne, la diffusion turbulente, l'impaction, l'interception, la sédimentation (Renoux et Boulaud, 1998). Par ailleurs, le dépôt dépend de nombreux autres paramètres comme, par exemple, la topographie du terrain, le substrat, les conditions micro-météorologiques (turbulence).

Pour caractériser le dépôt sec des aérosols, on utilise la vitesse de dépôt des particules (V_d , $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), définie comme le rapport entre le flux surfacique de particules au sol ($\text{g}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) et la concentration volumique de l'aérosol au voisinage du sol ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). La figure 2.15, empruntée à Pal Arya (1999), présente une synthèse des données expérimentales et des modèles de vitesse de dépôt sec des aérosols dans l'atmosphère en fonction des mécanismes de diffusion brownienne, de sédimentation et d'impaction inertielle.

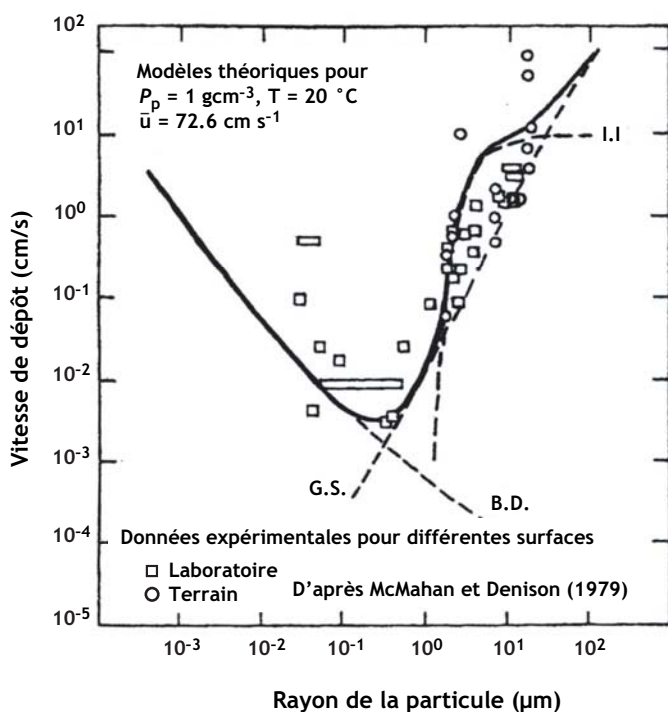


Figure 2.15. Données expérimentales et modèles de vitesses de dépôt induites par les mécanismes de diffusion brownienne (B.D.), de sédimentation (G.S.) et d'impaction inertielle (I.I.). Extrait de Pal Arya (1999).

À ce jour, il existe différents modèles de dépôt sec des aérosols qui prennent en compte des effets liés à la turbulence, au substrat et à la dimension des particules pour une large gamme de diamètres (de quelques nanomètres à 100 μm).

Pour les particules de diamètres supérieurs à 0,1 μm , ces modèles peuvent être comparés aux résultats expérimentaux ; cette comparaison n'est pas toujours aisée du fait de la dispersion des résultats – sur plusieurs ordres de grandeur – et du manque d'information sur certaines conditions expérimentales.

Dans le cas de particules de diamètres inférieurs à 0,1 μm , il n'existe pas de résultats expérimentaux permettant une comparaison avec les modèles de dépôt sec dans l'environnement (voir figure 2.15). Dans ce domaine de dimensions, le comportement physique des particules est principalement gouverné par la diffusion brownienne.

Le dépôt des aérosols ultra-fins d'origine anthropique dans l'environnement est peu étudié, pour différentes raisons. Dans ce domaine de dimensions, les particules évoluent rapidement, notamment par coagulation, dilution, attachement sur l'aérosol atmosphérique préexistant et dépôt sur les surfaces. En conséquence, lorsque l'on s'éloigne d'une source de PUF, on diminue la probabilité de rencontrer des particules en suspension ayant conservé leurs caractéristiques d'origine. Par exemple, une contamination (produit toxique) portée à la source par des PUF va rapidement se fixer sur l'aérosol atmosphérique préexistant et aura dès lors son comportement physique. Jacobson et Seinfeld (2004) ont montré la complexité et l'interaction des différents mécanismes de l'évolution des nanoparticules à proximité de zones d'émissions ponctuelle ou linéaire comme les échappements des moteurs essence ou diesels le long d'une voie de circulation.

2.4. Cas particuliers d'aérosols ultra-fins dans l'atmosphère

2.4.1. Émissions des moteurs à essence et diesels

Nombre d'études (Weingartner et coll., 1997 ; Kittelson, 1998 ; Maricq et coll., 1999 ; ACEA, 1999 ; Shi et coll., 2001 ; Harris et Maricq, 2001 ; Abu-Allaban et coll., 2002 ; Sakurai et coll., 2003) montrent que les moteurs à essence et diesels émettent de grandes quantités de nanoparticules ; leurs diamètres sont généralement inférieurs à 50 nm (diamètre équivalent en mobilité électrique). Ces études montrent que les moteurs diesels émettent également des particules de dimensions comprises entre 50 nm et 1 μm , donc de la même taille que celles du mode accumulation de l'aérosol atmosphérique. En effet, pour les moteurs diesels, le mode nucléation représente généralement moins de 10 % de la masse des particules mais plus de 90 % de leur nombre. La plus grande partie

de la masse des particules diesels est retrouvée dans le mode accumulation, et 5 à 20 % de la masse constitue le mode grosses particules (Kittelson et coll., 2004).

Les nanoparticules (< 50 nm) émises par les moteurs (à essence ou diesels) sont généralement volatiles : elles contiennent principalement des huiles et des sulfates imbrûlés, et se forment pendant le refroidissement dans les échappements et la dilution atmosphérique. Ces particules sont, pour la majeure partie, des agrégats composés de particules primaires sphériques qui coalescent pendant la combustion. Ces particules primaires sont composées de graphite (ou « black carbon ») et peuvent être recouvertes d'huile, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et de composés inorganiques (Steiner et coll., 1992 ; Kittelson, 1998 ; Norbeck et coll., 1998 ; Schauer et coll., 1999 ; Wehner et coll., 2001 ; Sakurai et coll., 2003). Du fait de la morphologie des agrégats formés, il est nécessaire d'apporter une attention particulière à la caractérisation des particules issues de la combustion, notamment en termes de diamètre équivalent. En effet, la surface des agrégats peut être plus élevée que celle d'une particule sphérique de même diamètre aérodynamique ou de même diamètre équivalent en mobilité électrique. Pour caractériser la forme des agrégats et relier le nombre de particules primaires aux différents diamètres équivalents couramment utilisés, on utilise la dimension fractale et la densité effective des agrégats (Friedlander, 2000 ; McMurry et coll., 2002 ; DeCarlo et coll., 2004 ; voir le point 1 de ce chapitre).

Depuis plus d'une dizaine d'années, l'évolution de la réglementation sur les émissions conduit à diminuer significativement les masses de particules émises par les moteurs. Étant donné que les moteurs diesels produisent des masses de particules 10 à 100 fois plus importantes que les moteurs à essence pour une même puissance développée, ils sont particulièrement concernés par cette évolution (Kittelson, 1998). Les moteurs à essence sont également concernés car, d'une part, ils émettent beaucoup de nanoparticules (< 50 nm) et peuvent, d'autre part, représenter la majorité des véhicules.

Rickeard et coll. (1996) ont montré que, dans la plupart des conditions urbaines d'utilisation, les moteurs à essence ont des coefficients d'émission en nombre plus faibles que les diesels. Néanmoins, dans le cas d'une circulation à haute vitesse sur route, les taux d'émission en nombre sont semblables : environ 10^{14} particules par kilomètre pour les moteurs essence, et 1 à $1,5 \times 10^{14}$ particules par kilomètre pour les moteurs diesels.

Il existe de nombreuses études sur la mesure de la concentration des aérosols dans les zones urbaines et à proximité des routes. Kittelson et coll. (2004) ont réalisé des mesures avec un laboratoire mobile (CNC, SMPS) sur les routes de l'agglomération de Minneapolis (Minnesota) avec des températures comprises entre 1 °C et 13 °C. Leurs résultats montrent que la concentration en nombre est comprise entre 10^4 et 10^6 cm⁻³ et que la majorité des particules ont un diamètre inférieur à 50 nm. Les plus fortes concentrations de particules nanométriques (< 50 nm) correspondent à une circulation à vitesse élevée (> 80 km/h). Dans une situation de trafic chargé, avec des vitesses inférieures à 32 km/h,

les concentrations sont plus faibles mais les diamètres médians en nombre plus élevés. Dans le cas d'un trafic prédominant de voitures à essence, ils ont calculé des coefficients d'émission de particules de $1,9 \times 10^{14}$ à $9,9 \times 10^{14}$ particules par kilomètre, correspondant à des taux de production de $2,2 \times 10^{15}$ à 11×10^{15} particules par kg de carburant.

Une étude plus récente (Johnson et coll. 2005), également réalisée avec un laboratoire mobile, distingue les émissions provenant des moteurs à essence de celles des diesels, en effectuant des mesures le week-end et les jours ouvrés, et en relevant les proportions entre ces trafics. Les essais se sont déroulés avec des conditions de circulation fluide en période d'été sur les routes de l'agglomération de Minneapolis. Sur la base des mesures réalisées avec un CNC, permettant de détecter les particules de diamètre supérieur à 3 nm, les auteurs calculent un taux de production en nombre égal à $13,4 \pm 2,0 \times 10^{15}$ particules par kg de carburant diesel et de $7,1 \pm 1,6 \times 10^{15}$ particules par kg de carburant essence. Ces valeurs sont cohérentes avec celles de Kittelson et coll. (2004) ; l'ensemble montre que le nombre de particules émises par les moteurs à essence est beaucoup plus dépendant des conditions de vitesse et de chargement du véhicule que pour les moteurs diesels (Kittelson et coll., 2005).

La synthèse de Kittelson (1998) sur les nanoparticules produites par les diesels montre que les concentrations en nombre des aérosols produits dépendent fortement de la composition du carburant (teneur en soufre) et des technologies des moteurs. D'après Bagley et coll. (1996), un moteur diesel moderne à injection à très haute pression (105 Mpa en pression de pointe) produit des concentrations en nombre de nanoparticules beaucoup plus élevées (environ un facteur 10) que des moteurs d'ancienne génération.

2.4.2. Aérosol radioactif naturel

Le radon (^{222}Rn et ^{220}Rn) est un gaz radioactif émetteur alpha naturellement présent dans l'atmosphère. Ce gaz émane en permanence des sols. Il est issu de la désintégration de l'uranium (^{238}U) et du thorium (^{232}Th) contenus dans tous les sols et les roches. Dans l'air atmosphérique, on trouve des concentrations en radon comprises entre $4 \text{ Bq}\cdot\text{m}^{-3}$ et $15 \text{ Bq}\cdot\text{m}^{-3}$; ces concentrations sont beaucoup plus faibles au-dessus des océans. Dans les habitations (aux États-Unis), on trouve des concentrations lognormales avec une valeur médiane de $48 \text{ Bq}\cdot\text{m}^{-3}$ et un écart-type géométrique compris entre 2 et 2,5. Cela signifie que l'on trouve des concentrations en radon supérieures à $1\,500 \text{ Bq}\cdot\text{m}^{-3}$ dans environ 5 % des habitations (Cohen, 2001). Ces concentrations dépendent principalement de la composition du sol, du coefficient d'émanation et de la ventilation intérieure.

Lors de sa désintégration, le radon donne naissance à des éléments radioactifs solides qui peuvent se déposer notamment dans les voies respiratoires lors de l'inhalation. Le ^{222}Rn , de période 3,823 jours, donne naissance au ^{218}Po , de période 3,05 minutes, également un émetteur alpha. Le ^{218}Po donne lui aussi naissance à d'autres éléments

radioactifs. Les ^{222}Rn et ^{218}Po sont toujours présents de façon simultanée dans l'environnement ou les atmosphères intérieures, leur proportion à l'équilibre dépendant des conditions de ventilation.

Lorsqu'ils sont créés, une partie des atomes de ^{218}Po se fixent rapidement aux particules de l'aérosol ambiant ; une autre partie réagit avec des molécules gazeuses à l'état de traces dans l'atmosphère. Par ailleurs, le ^{218}Po électriquement chargé peut attirer des molécules d'eau et former des clusters. Ces mécanismes donnent rapidement naissance à des particules nanométriques qui constituent la fraction libre des descendants du radon. Ces nanoparticules ont des coefficients de diffusion très élevés, compris entre $2,5 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $8 \times 10^{-2} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui correspond à des tailles comprises entre 0,5 nm et 5 nm (Hopke, 1989 et 1990). Après leur formation, elles vont rapidement se fixer à l'aérosol ambiant ou se déposer sur les surfaces disponibles. Comme le ^{218}Po est formé en permanence, il existe toujours une faible fraction libre de cet élément sous la forme de nanoparticules dans l'atmosphère.

Beaucoup d'études ont été menées en France sur l'aérosol radioactif naturel depuis les années 1965, notamment par Renoux (1965) et Tymen (1978). Ce dernier a montré, à partir de mesures réalisées à Brest, qu'en moyenne 42 % de la radioactivité d'origine naturelle portée par l'aérosol atmosphérique est retrouvée sur des particules de diamètre inférieur à 20 nm ; cette fraction est variable en fonction des conditions météorologiques.

Conclusion

L'aérosol atmosphérique est constitué de particules de natures très différentes (minérales, organiques, biologiques). Leur concentration, très variable dans le temps, dépend en partie des mécanismes de production ; elle est également variable dans l'espace en fonction des mécanismes de dispersion, d'évolution et de dépôt. L'étude des PUF de l'atmosphère est complexe du fait de leur évolution rapide : coagulation, condensation, dépôt ; elle est par ailleurs limitée par le stade de développement des instruments et des méthodes de mesure. C'est particulièrement le cas pour les particules issues de combustion présentant une forme fractale. On observe depuis quelques années un essor considérable de la physique et de la métrologie des aérosols pour caractériser de façon pertinente ces particules et mieux comprendre leur formation et leur comportement.

Bibliographie

Abu-Allaban M, Coulomb W, Gertler AW, Gillies J, Pierson WR, Rogers CF, Sagebiel JC, Tarnay L (2002). Exhaust particle size distribution measurements at the Tuscarora Mountain Tunnel. *Aerosol Sci Technol* **36**, 771–789.

- ACEA, Association of European Automobile Manufacturers (1999). Programme on emissions of fine particles from passenger cars. ACEA Report, Brussels, December.
- Aitken J (1880). On dust, fogs and clouds. *Nature* **14**, 384-385.
- Aitken J (1888). On the number of dust particles in the atmosphere. *Nature* **37**, 187-206.
- Andreae MO (1995). Climatic effects of changing atmospheric aerosol levels. In: World Survey of Climatology. Future Climates of the World, **16**, 341-392. ed. by Elsevier, Amsterdam.
- Andreas EL (1998). A new sea spray generation function for wind speeds up to 32 m.s^{-1} . *J Phys Oceanogr* **28**, 2175-2184.
- Andreas EL, Pattison MJ, Belcher SE (2001). "Production rates of sea-spray droplets" by M. J Pattison and S. E. Belcher: Clarification and elaboration. *J Geophys Res* **106**, 7157-7161.
- Bagley ST, Baumgard KJ, Gratz LG, Johnson JH, Leddy DG (1996). Characterization of fuel and aftertreatment device effects on diesel emissions. Health Effect Institute (HEI), Research Report n° 76.
- Boulaud D (1977) Contribution à l'étude des réactions en phase gazeuse de l'anhydride sulfureux. Étude de la formation et de l'évolution des aérosols produits dans ces réactions. Thèse d'état, Université Paris VI. Rapport CEA-R-4877.
- Cohen BS (2001). Radon and its short-lived decay product aerosols. In : Aerosol Measurement, Principles Techniques and Applications. 2° ed, Baron et Willeke, Wiley & Sons.
- Coulier PJ (1875). Note sur une nouvelle propriété de l'air. *J Pharm Chim Paris Sér. 4*, **22**, 165-172.
- d'Almeida GA (1991). Atmospheric aerosols: Global climatology and radiative characteristics. Ed. by Deepak, Hampton.
- DeCarlo PF, Slowik JG, Worsnop DR, Davidovits P, Jimenez JL (2004). Particle morphology and density characterization by combined mobility and aerodynamic diameter measurements. Part 1: Theory. *Aerosol Sci Technol* **38**, 1185-1205.
- Esmen NA, Corn M (1971). Residence time of particles in urban air. *Atmosph Environ* **5**, 571-578.
- Friedlander SK (2000). Smoke, Dust and Haze Fundamentals of Aerosol Dynamics. 2nd Ed, Oxford University Press.
- Harris SJ, Maricq MM (2001). Signature size distributions for diesel and gasoline engine exhaust particulate matter. *J Aerosol Sci* **32**, 749-764.
- Harrison RM (1996). Airborne particulate matter in the united kingdom. Third report of the quality of urban air review group. University of Birmingham, Edgbaston, England.
- Hidy GM (1984). Aerosols, An Industrial and Environmental Science. Ed. by Academic Press Inc.
- Hinds WC (1999). Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles. 2° ed. by Wiley & Sons.
- Hopke PK (1989). Initial behavior of ^{218}Po in indoor air. *Environ Int* **15**, 299-308.
- Hopke PK (1990). A critical review of measurement of the unattached fraction of radon decay products. Technical Report Series of the US Department of Energy (DOE).
- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change (2001). Climate Change 2001, the scientific basis. Ed. by Cambridge University Press.
- Jacobson MZ, Seinfeld JH (2004). Evolution of nanoparticle size and mixing state near the point of emission. *Atmosph Environ* **38**, 1839-1850.

- Johnson JP, Kittelson DB, Watts WF (2005). Source apportionment of diesel and spark ignition exhaust aerosol using on-road data from the Minneapolis metropolitan area. *Atmosph Environ* **39**, 2111-2121.
- Kittelson DB, Watts WF, Johnson JP (2004). Nanoparticle emissions on Minnesota highways. *Atmosph Environ* **38**, 9-19.
- Kittelson DB, Watts WF, Johnson JP (2005). Ultrafine and nanoparticle emissions: A new challenge for internal combustion engine designers. In: *Aerosols Handbook. Measurement, Dosimetry, and Health Effects*. Ed. by Ruzer LS, Harley NH, CRC Press.
- Kittelson DB (1998). Engines and nanoparticles: a review. *J Aerosol Sci* **29**, 575-588.
- Kulmala M, Vehkamäki H, Petäjä T, Dal Maso M, Lauri A, Kerminen VM, Birmili W, McMurry PH (2004). Formation and growth rates of ultrafine atmospheric particles: a review of observations. *J Aerosol Sci* **35**, 143-176.
- Maricq MM, Chase RE, Podsiadlik DH, Vogt R (1999). Vehicle exhaust particle size distributions: a comparison of tailpipe and dilution tunnel measurements. SAE Paper 1999-01-1461, SAE International, Warrendale, PA.
- Marley MS (2000). *ASP Conf. Ser.* **212**, From Giant Planets to Cool Stars, ed. Griffith CA and Marley MS (San Francisco: ASP), 152.
- McMurry PH (2000). A review of atmospheric aerosol measurements. *Atmosph Environ* **34**, 1959-1999.
- McMurry PH, Wang X, Park K, Ehara K (2002). The relationship between mass and mobility for atmospheric particles: a new technique for measuring particle density. *Aerosol Sci Technol* **36**, 227-238.
- Monahan EC, Spiel DE, Davidson KL (1986). A model of marine aerosol generation via whitecaps and wave disruption in oceanic whitecaps. In: *Oceanic whitecaps and their role in air-sea exchange processes*, EC Monahan and GM Niocaill (eds), Reidel Publishing, Dordrecht, Holland, pp. 167-174.
- Norbeck JM, Durbin TD, Truex TJ (1998). Measurement of primary particulate matter emissions from light-duty motor vehicles. Final Report for CRC Project No. E-24-2.
- Pal Arya S (1999). *Air Pollution meteorology and dispersion*. Oxford University Press.
- Papastefanou C (2006). Residence time of tropospheric aerosols in association with radioactive nuclides. *Applied Radiat Isotopes* **64**, 93-100.
- Piazzola J, Forget P, Despiau S (2002). A sea-spray generation function for fetch-limited conditions. *Ann Geophys* **20**, 121-131.
- Podzimek J (1985). 100 year evolution of Aitken nuclei counters, current and future problems. *J Rech Atmos* **19**, 257-274.
- Podzimek J (1989). John Aitken's contribution to atmospheric and aerosol sciences: One hundred years of condensation nuclei counting. *Bull Am Meteorol Soc* **70**, 1538-1545.
- Preining O, Davis EJ (2000). *History of Aerosol Science*. Ed. by Preining and Davis.
- Raes F, Van Dingenen R, Vignati E, Wilson J, Putaud JP, Seinfeld JH, Adams P (2000). Formation and cycling of aerosols in the global troposphere. *Atmosph Environ* **34**, 4215-4240.
- Renoux A (1965). Étude des ions radioactifs de l'atmosphère. Thèse de l'Université de Paris, Rapport CEA R-2771, 1965.
- Renoux A, Boulaud D (1998). *Les aérosols : Physique et Métrologie*. Ed. Lavoisier, technique & documentation.

- Rickeard DJ, Bateman JR, Kwon YK, McAughey JJ, Dickens CJ (1996). Exhaust particle size distribution: vehicle and fuel influences in light duty vehicles. SAE paper n°961980.
- Sakurai H, Tobias HJ, Park K, Zarling D, Docherty K, Kittelson DB, McMurry PH, Ziemann PJ (2003). On-line measurements of diesel nanoparticle composition and volatility. *Atmosph Environ* **37**, 1199–1210.
- Schauer JJ, Kleeman MJ, Cass GR, Simoneit BR (1999). Measurement of emissions from air pollution sources. 2. C1 through C30 organic compounds from medium duty diesel trucks. *Environ Sci Technol* **33**, 1578–1587.
- Seinfeld JH, Pandis SN (1998). Atmospheric Chemistry and Physics. Ed by Wiley, New York.
- Shi JP, Evans DE, Khan AA, Harrison RM (2001). Sources and concentration of nanoparticles (<10 nm diameter). in the urban atmosphere. *Atmosph Environ* **35**, 1193–1202.
- Steiner D, Burtchnew H, Grass H (1992). Structure and disposition of particles from a spark ignition engine. *Atmosph Environ* **26**, 997–1003.
- Tymen G (1978). Répartition granulométrique de l'aérosol naturel et des particules radioactives issues du radon, en atmosphère maritime et urbaine peut polluée. Thèse Université de Bretragne Occidentale. Rapport CEA-R4965, 1979.
- Wehner B, Philippin S, Wiedensohler A, Scheer V, Vogt R (2001). Volatility of aerosol particles next to a highway. *J Aerosol Sci* **32**, S117–S118.
- Weingartner E, Keller C, Stahel WA, Burtscher H, Baltensperger U (1997). Aerosol emission in a road tunnel. *Atmosph Environ* **31**, 451–462.
- Whiby KT (1978). The physical characteristics of sulfur aerosols. *Atmosph Environ* **12**, 135–159.

3. Aérosols ultra-fins en milieux professionnels

O. Witschger

Introduction

Sur les lieux de travail, les particules ultra-fines (PUF) peuvent être émises dans l'air par différentes sources qui dépendent du type d'activité et du procédé mis en jeu. Ce chapitre fait le point sur la présence et les caractéristiques de PUF en milieux professionnels dans le but d'estimer l'exposition par inhalation.

De nombreuses études expérimentales ont été menées sur la caractérisation des aérosols sur les lieux de travail (Vincent, 1995), notamment pour connaître au mieux l'exposition des travailleurs, évaluer le niveau de risque pour la santé, et enfin le réduire. Même si les PUF sont présentes depuis de nombreuses années dans l'air de certains lieux de travail, ce n'est que récemment qu'elles font l'objet d'études spécifiques, essentiellement en raison :

- du développement de techniques instrumentales et de méthodes de mesures qui permettent de caractériser les PUF dans l'air ;
- de l'intérêt croissant porté à leurs effets néfastes potentiels sur la santé ;
- de la nécessité de connaître l'exposition suivant des métriques différentes de la masse ;
- du fort développement des nanotechnologies et, plus précisément, des nanomatériaux.

La caractérisation des PUF nécessite une instrumentation spécifique et des méthodes qui diffèrent de celles utilisées habituellement en hygiène du travail, comme vu au point 1. Il convient d'insister sur le fait que l'utilisation de méthodes non spécifiques peut conduire à conclure à l'absence de PUF alors même qu'il y en a. Une telle erreur peut être due à une limite de détection en taille de l'instrument trop haute, couplée à une efficacité de détection faible. Par exemple, les spectromètres de taille utilisés en hygiène du travail (utilisant généralement une détection optique) ont classiquement une efficacité de détection qui décroît nettement sur le domaine submicronique, ce qui limite fortement leur intérêt pour caractériser les PUF, voire les rend inadéquats. À titre d'exemple, la figure 2.16 compare les distributions granulométriques en nombres obtenues avec l'ELPI et avec le spectromètre granulométrique GRIMM G1.105 lors de mesures effectuées en parallèle et au même endroit dans un atelier d'extrusion soufflage de film PVC.

Le GRIMM G1.105 est un instrument portable dont l'application principale est le suivi dans le temps de la distribution en taille et de la concentration en nombre des poussières dans l'air ; la mesure s'effectue sur 8 canaux de mesures entre environ 0,75 μm et 15 μm . La figure 2.16 montre clairement que, dans cet atelier, l'ELPI mesure bien la totalité de l'aérosol, le mode de la distribution en nombre se situant autour de 0,4 μm . Le GRIMM G1.105, quant à lui, ne détecte quasiment aucune des particules, pourtant présentes en grand nombre dans l'air (environ 10^5 particules·cm⁻³). L'utilisation seule du GRIMM G1.105 est donc inadéquate si l'on souhaite caractériser la fraction submicronique des particules dispersées dans l'air ; bien d'autres appareils conduiraient à la même erreur.

Une autre raison qui peut expliquer pourquoi, jusqu'à présent, les PUF n'étaient pas considérées par les hygiénistes du travail comme un facteur particulier de risque pour la santé tient dans le fait que la quasi-totalité des mesures d'exposition sont effectuées suivant une métrique basée sur la concentration en masse (par exemple en mg·m⁻³). Ces mesures d'exposition ont donc toujours mis l'importance, le « poids », sur la fraction micronique de l'aérosol ambiant. Afin d'illustrer ce point, la figure 2.17 montre deux distributions granulométriques, l'une en « nombre » et l'autre en « masse », du *même* aérosol.

Il s'agit ici d'un aérosol urbain, typiquement caractérisé par une distribution relativement large, à plusieurs modes, avec présence de particules nanométriques et microniques (voir point précédent). On voit que les deux distributions sont distinctes, et que les particules de taille inférieure à 100 nm constituent de l'ordre de 95 % de la population

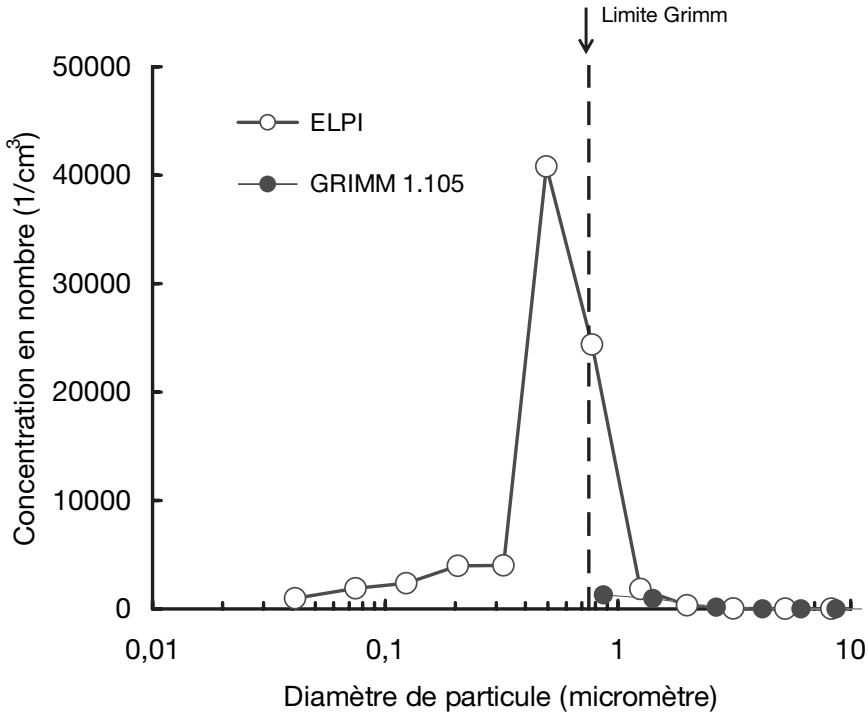


Figure 2.16. Comparaison entre les distributions granulométriques en nombre mesurées à l'aide d'un ELPI (cercles vides) et d'un spectromètre GRIMM G1.105 (cercles pleins) dans un atelier industriel en présence de particules submicroniques liquides émises par un procédé d'extrusion soufflage.

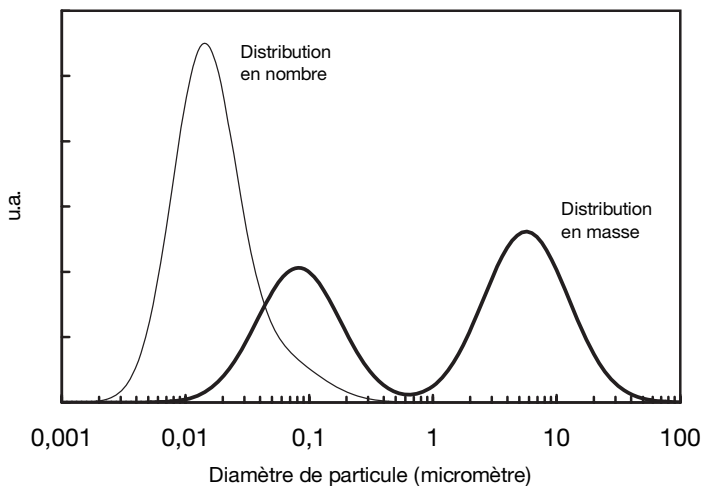


Figure 2.17. Distribution granulométrique caractéristique de l'aérosol urbain représentée soit en masse soit en nombre (d'après Hinds, 1999).

en nombre alors qu'elles « pèsent » moins de 25 % de la masse. En conséquence, si la technique de mesure est basée sur un comptage des particules (cette technique doit être capable de détecter des particules de dimensions nanométriques comme les CNC, voir ce chapitre, point 1.2.1), l'aérosol paraîtra composé pour l'essentiel de particules submicroniques. En revanche, si la technique de mesure est basée sur la masse, par exemple à l'aide d'un échantillonneur et d'un filtre ou même d'une technique TEOM (voir chapitre 3.1), l'attention est portée sur la fraction micronique de l'aérosol. Comme toutes les méthodes destinées à caractériser la qualité particulaire de l'air en santé-environnement sont basées sur la mesure de la concentration en masse (sauf celles qui comptent des fibres par microscopie), les données obtenues ont toujours mis (et mettent toujours) en évidence la fraction la plus grosse de l'aérosol ambiant : les études de la relation exposition - effet chez l'homme qui ont été et sont encore réalisées suivant cette métrique « masse » ont donc toujours favorisé la fraction la plus grossière, alors qu'il est possible que ce soit en réalité la plus fine qui se trouve à l'origine de l'effet observé. C'est ce que semblent suggérer certaines études épidémiologiques des effets sur la santé des PUF environnementales (voir chapitre 4, point 2). Ce point apparaît important dès lors que les particules sont faiblement solubles, voire insolubles.

En résumé, si les PUF n'ont pas été caractérisées jusqu'à présent dans l'air des lieux de travail, c'est que les méthodes de mesure classiques les ignorent quasiment.

Pour retenir les études citées dans ce chapitre, nous avons pris en compte :

- les études expérimentales réalisées sur les lieux de travail et non celles réalisées en laboratoire, non transposables en dehors de cas particuliers (reproduction d'un poste de travail réel en laboratoire) ;
- les études expérimentales qui ont mis en œuvre l'instrumentation spécifique à la caractérisation des PUF, c'est-à-dire une au moins des techniques décrites au début de ce chapitre.

Enfin, comme déjà vu, les méthodes destinées à évaluer l'exposition professionnelle (mesure effectuée au niveau de l'individu) n'existant pas à ce jour, la totalité des études a consisté à caractériser les sources ou l'aérosol en ambiance.

Sources de particules ultra-fines en milieux professionnels

Ne sont traitées ici que des PUF liées de manière directe ou indirecte à un procédé industriel. Ces PUF vont « s'ajouter » à celles présentes naturellement dans l'air ambiant (voir point 2). À l'intérieur des habitations, les PUF sont également présentes ; elles proviennent pour partie de l'extérieur (Mosley et coll., 2001 ; Zhu et coll., 2002) et pour partie de différentes sources liées aux besoins domestiques (par exemple cuisine, chauffage, utilisation de sècheurs à linge au gaz, etc. ; Abraham et coll., 2002 ; Dennekamp et coll., 2001, 2002 ; See et Balasubramanian, 2006 ; Wallace, 2006 ; Wayne et coll., 2006). Mais, bien souvent, la source la plus importante en PUF dans une habitation est

le tabac, plus rarement l'utilisation d'encens ou de bougies (Morawska et Zhang, 2002 ; Hussein et coll., 2006 ; Zai et coll., 2006).

Lors d'une étude exploratoire, Riesenfel et coll. (2000) ont mesuré les concentrations en PUF en trois emplacements d'un hôpital : une zone d'accueil, une chambre à exposition contrôlée, et une zone de travaux située à proximité. Les concentrations moyennes en nombre, mesurées sur plusieurs dizaines d'heures, étaient respectivement de $4 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-3}$, $6 \cdot 10^2 \text{ cm}^{-3}$, et $3 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-3}$. Les auteurs ont également mis en évidence la grande variabilité temporelle de la granulométrie en nombre, et le fait que les concentrations en nombre et en masse n'étaient pas bien corrélées. Ils concluent que des PUF sont présentes en environnement hospitalier et, à juste titre, qu'il n'est pas indiqué de généraliser leurs résultats car : 1) les mesures ont été réalisées sur une période courte ; 2) elles n'ont pas été faites en parallèle (en raison de la non-disponibilité du matériel instrumental) ; et 3) elles ont eu lieu seulement en hiver (on sait que les caractéristiques de l'aérosol ambiant varient en fonction des saisons). Enfin, aucune analyse physicochimique n'est présentée ; il est donc difficile de faire un lien avec des sources potentielles.

D'une façon générale, la présence de PUF dans l'air des locaux est due à de multiples sources ; sans technique spécifique ni stratégie précise, il est difficile de généraliser les résultats obtenus.

3.1. Catégories et terminologie

En milieux professionnels, on peut distinguer trois catégories de PUF :

- 1 : les émissions secondaires liées à certains procédés industriels ;
- 2 : les émissions lors de la fabrication ou de la manipulation de matériaux *connus* à structure nanométrique ;
- 3 : les émissions lors de la fabrication ou de la manipulation de *nouveaux matériaux* à structure nanométrique, que l'on désignera par la suite par le terme « nanomatériaux ».

Cette catégorisation rejoint celles adoptées par d'autres (Gijsbers et coll., 2000 ; Aitken et coll., 2004 ; Ostiguy et coll., 2006), ainsi que par le document ISO « Atmosphères des lieux de travail – Particules ultra-fines, nanoparticules et aérosols nano-structurés – Caractérisation et estimation de l'exposition par inhalation » (ISO, 2007).

La première catégorie regroupe les PUF non produites à des fins commerciales, alors que les deux suivantes concernent des matériaux à structures nanométriques produits à plus ou moins grande échelle. La distinction entre les catégories 2 et 3 peut se justifier par le fait que :

- les matériaux nanostructurés (essentiellement des poudres) de la catégorie 2 sont fabriqués depuis quelques années et les quantités produites sont sans commune mesure avec celles de la catégorie 3 ;

- en termes d'études sur les effets (épidémiologie, toxicologie) et sur les expositions, des données sont disponibles pour la catégorie 2, alors que la catégorie 3 (nanomatériaux) est pour le moment quasiment inexplorée.

Deux substances largement employées et manipulées dans l'industrie qui entrent dans la catégorie 2 sont le noir de carbone et le TiO₂ ultra-fin.

D'un point de vue terminologique, une « particule ultra-fine » désigne une particule ayant un diamètre nominal inférieur à 100 nm, le diamètre en question pouvant être géométrique, aérodynamique, de mobilité, de diffusion, etc. (voir point 1). D'après l'ISO (2007), cette désignation concerne plutôt les particules dispersées dans l'air issues d'émissions secondaires (catégorie 1). L'aérosol correspondant sera donc un « aérosol ultra-fin ». On utilisera le terme de « particules ultra-fines » pour désigner les particules présentes, par exemple, dans une fumée de soudage.

Pour les catégories 2 et 3, les particules émises seront plutôt désignées par « nanoparticules » et « particules nano-structurées » et l'aérosol correspondant « nano-aérosol ». D'après le même document (ISO, 2007), la définition d'une nanoparticule est identique à celle d'une PUF, et une particule nanostructurée est une particule avec des caractéristiques structurales inférieures à 100 nm, qui peuvent influencer ses propriétés physiques, chimiques et/ou biologiques. Une particule nanostructurée peut être de dimension sensiblement supérieure à 100 nm ; par exemple, un agglomérat de nanoparticules d'un diamètre de 500 nm ou plus sera considéré comme une particule nanostructurée. Une particule nanostructurée peut également être un agglomérat de « particules primaires », ce dernier terme désignant une particule qui ne résulte pas d'un regroupement de particules plus petites. Par extension, on parlera de poudre ultra-fine ou de poudre nanostructurée pour une poudre constituée de particules nanostructurées. Par exemple, le TiO₂ ultrafin est une poudre nanostructurée.

3.2. Émissions secondaires liées à certains procédés industriels

Comme pour l'environnement, la présence de PUF dans l'atmosphère de travail, liées aux émissions secondaires, est le plus souvent associée au processus de nucléation de vapeurs, suivi des processus d'évolution en taille que sont la condensation et la coagulation. Mais la combustion et certains procédés mécaniques peuvent également être à l'origine de PUF.

Le tableau 2.VIII dresse une liste non exhaustive des différentes sources de PUF liées aux émissions secondaires que l'on peut rencontrer en milieux professionnels.

Lorsqu'un procédé comporte une phase thermique suffisante pour induire la fusion, des vapeurs (par exemple métalliques) se forment ; elles sont transformées en particules

Émissions secondaires de procédés industriels	
Groupe d'aérosols	Sources potentielles
Procédés thermiques	Fonderie et affinage des métaux (acier, fer, aluminium...) Métallisation (galvanisation...) Soudage et gougeage Découpage de métaux (laser, torche thermique...) Traitement thermique de surface (laser, projection thermique...) Application de résines, de cires... Cuisine industrielle ...
Combustion	Émissions des moteurs diesels, à essence ou à gaz Centrale d'incinération, centrale thermique, crémation Fumage de produits alimentaires Chauffage au gaz ...
Procédés mécaniques	Usinage et ponçage (métaux, plastiques...) Perçage de précision Polissage fin (abrasion) ...

Tableau 2.VIII. Liste non exhaustive de sources potentielles de PUF liées aux émissions secondaires de procédés industriels.

primaires de dimensions nanométriques par un processus de nucléation homogène. La distribution granulométrique initiale des particules formées est fortement liée aux conditions environnementales (température, espèces présentes, etc.). Suivent ensuite la condensation, qui va faire grossir la particule individuelle par diffusion de vapeurs additionnelles sur la surface de la particule, et l'agglomération, processus où les particules individuelles entrent en collision du fait de la diffusion brownienne et s'agglomèrent. Là également, la distribution finale de l'aérosol formé ainsi que sa concentration dans l'air (par exemple en nombre, m^{-3}) dépend d'un grand nombre de paramètres environnementaux (Vincent et Clement, 2000 ; Zimmer, 2002). Au final, les particules de l'aérosol sont généralement composées d'agglomérats ou d'agrégats. La figure 2.18 montre deux exemples d'agglomérats prélevés dans des fumées métallurgiques (soudage et four électrique). On voit sur ces clichés que les particules primaires ont des dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, ce qui est souvent le cas pour les fumées métallurgiques. On observe également que la forme de l'agglomérat peut être complexe et imposer une caractérisation de type analyse fractale (voir point 1).

Le processus de coagulation peut également conduire à la diffusion de particules primaires sur la surface d'une particule plus grosse (figure 2.19). Il pourrait s'ensuivre une modification de la toxicité par modification de l'état de surface, si la particule est insoluble.

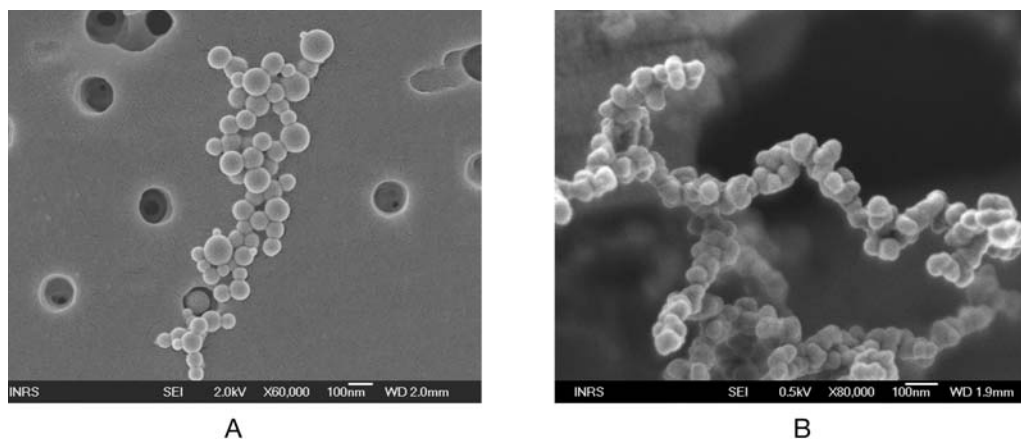


Figure 2.18. Particules agglomérées dans une fumée métallurgique. Prélèvements effectués sur membrane nuclepore™ et images obtenues en microscopie électronique à balayage. A : fumée de soudage MIG (aluminium). B : fumée issue d'un four électrique (alliage cuivre - béryllium). ©Rastoix/INRS.

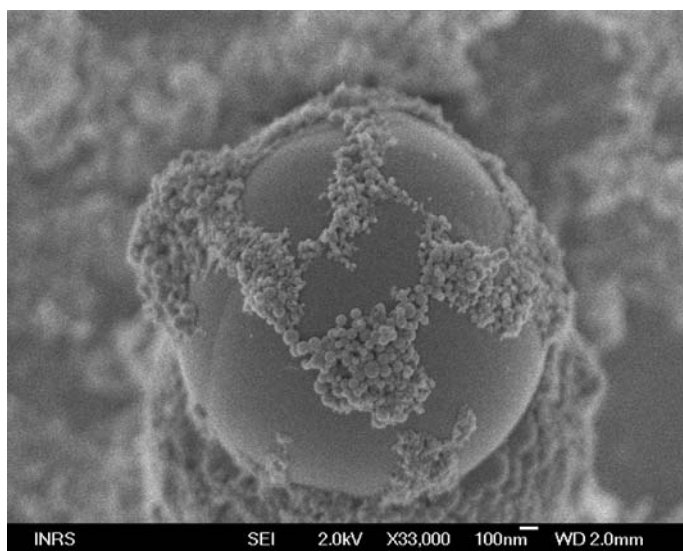


Figure 2.19. Exemple d'une particule de taille micronique sur laquelle a diffusé un grand nombre de particules primaires. Prélèvement effectué sur membrane nuclepore™ dans une fumée de soudage MIG (aluminium) et images obtenues en microscopie électronique à balayage. ©Rastoix/INRS.

3.2.1. Soudage et autres procédés métallurgiques

Quelques publications apportent des éléments relatifs aux PUF parmi les procédés listés, par exemple :

- pour les procédés d’élaboration et de traitement des métaux et alliages : Schimberg et Ukkonen, 2003 ; Thomassen et coll., 2006.
- pour le soudage : Rödelserger et coll., 2000 ; Spiegel-Ciobanu, 2003 ; Zimmer et Biswas, 2000.
- pour le brasage : Zimmer et Biswas, 2001.

Ces procédés conduisent à des émissions secondaires où un très grand nombre de PUF sont produites ; elles consistent en métaux ou oxydes métalliques plus ou moins complexes, généralement peu solubles et de grandes surfaces spécifiques (Gijsbers et coll., 2000 ; Aitken et coll., 2004).

Depuis 1998, le BGIA conduit un programme de mesures des PUF sur les lieux de travail, notamment à l’aide d’une technique SMPS. À l’heure actuelle, la quasi-totalité des lieux de travail visités concernent les émissions secondaires (catégorie 1). Le tableau 2.IX présente les caractéristiques d’aérosols mesurés au voisinage de procédés de soudage ou de brasage (Möhlmann, 2005). On peut voir que les concentrations en nombre varient d’un procédé à un autre ; elles atteignant parfois 10^6 particules·cm⁻³ (un milliard de particules par litre d’air...). Les aérosols sont globalement caractérisés par des diamètres médians en nombre inférieurs à 100 nm. D’après l’auteur, les données présentées correspondent aux valeurs les plus couramment rencontrées ; elles sont par exemple relativement semblables à celles de l’étude exploratoire de Wake et coll. (2002).

Procédé	Concentration en nombre (cm ⁻³)	Diamètre médian en nombre (nm)
Soudage WIG CrNi ^a (Tungstène gaz inerte)	10 ⁵ à 10 ⁶	60 à 100
Soudage MAG ^a (Métal gaz actif)	2·10 ⁴ à 10 ⁵	70 à 170
Soudage MAG ^b	10 ⁵ à 10 ⁶	70 à 100
Brasage manuel ^a	2,5·10 ¹ à 7·10 ⁴	40 à 65
Soudage manuel ^b	4,5·10 ⁴	50 à 55

Tableau 2.IX. Gammes des concentrations en nombre et diamètres médians des aérosols ultra-fins mesurés au voisinage de différents procédés de soudage et brasage. Mesures effectuées à l’aide d’un SMPS sur une plage de 14 à 673 nm. D’après Möhlmann (2005). ^a Mesure effectuée en présence d’une aspiration.

^b Mesure effectuée sans aspiration.

Ce tableau montre également que le captage à la source peut être efficace, entraînant ici une diminution d'un ordre de grandeur de la concentration en nombre pour le soudage MAG (*Metal Active Gas*). Il faut rester prudent avant de généraliser de telles données à l'ensemble des lieux de travail mettant en œuvre un même procédé. En effet, les caractéristiques de l'aérosol sont fonction non seulement du procédé mais aussi de l'environnement aéraulique, de la présence d'une aspiration, etc. Ce même auteur rapporte par exemple que la concentration la plus forte mesurée au niveau d'un poste de soudage était d'environ $4 \cdot 10^8$ particules·cm⁻³, soit deux ordres de grandeur au-dessus de la valeur maximale rapportée ici.

Les fumées de soudage sont un mélange complexe de gaz et de particules en très grand nombre (voir données toxicologiques, chapitre 5, point 4). Les vapeurs métalliques formées au niveau du point de soudure du fait des hautes températures réagissent rapidement avec l'air pour former de agglomérats de particules d'oxydes métalliques (voir figures 2.20 et 2.21). La plupart des substances présentes dans les fumées proviennent des électrodes consommées pendant le soudage. De nombreuses réactions ont lieu dans ces fumées, et l'aérosol final, auquel est exposé le soudeur, a des caractéristiques qui dépendent de plusieurs facteurs dont, en premier lieu, le procédé de soudage (à l'arc électrique, à l'arc sous protection gazeuse, à l'arc plasma, etc.). Parmi les procédés fréquemment utilisés, on trouve le soudage à arc sous protection gazeuse, encore dénommé soudage MIG ou MAG. Dans ce procédé, des gaz de protection (inertes ou actifs) sont continuellement soufflés autour de l'arc pour protéger la soudure de l'oxydation. Des agents fluxants peuvent être incorporés dans l'électrode dans ce même but. L'utilisation de flux gazeux ou de traitements des surfaces des électrodes et/ou de la base à souder peuvent également modifier les caractéristiques physiques et chimiques de l'aérosol.

Parmi les travaux expérimentaux les plus complets sur la caractérisation physico-chimique de la fraction ultra-fine des fumées de soudage, on peut citer ceux de Zimmer (Zimmer et Biswas, 2000 et 2001 ; Zimmer, 2002). À titre d'illustration, la figure 2.20 montre l'effet d'un agent fluxant sur la distribution granulométrique en nombre lors d'une opération de brasage avec un alliage commun à base de cuivre : la granulométrie et la concentration de l'aérosol sont modifiées. La concentration de l'aérosol est diminuée d'environ deux ordres de grandeur et la granulométrie décalée vers des diamètres plus petits. Le mode de la distribution, aux alentours de 40 à 50 nm hors agent fluxant, passe à environ 150 nm en sa présence.

La figure 2.21 montre l'effet que peut avoir une modification de la composition du gaz protecteur dans un procédé à l'arc (soudage MIG) en termes de concentration et de granulométrie de l'aérosol. L'utilisation d'un mélange 90 % Ar/10 % CO₂ tend à diminuer considérablement l'émission de particules en dessous de 50 nm par rapport à 100 % de CO₂. Il est donc possible de diminuer l'émission en modifiant un paramètre du procédé, et donc d'avoir une action concrète sur l'exposition des personnes.

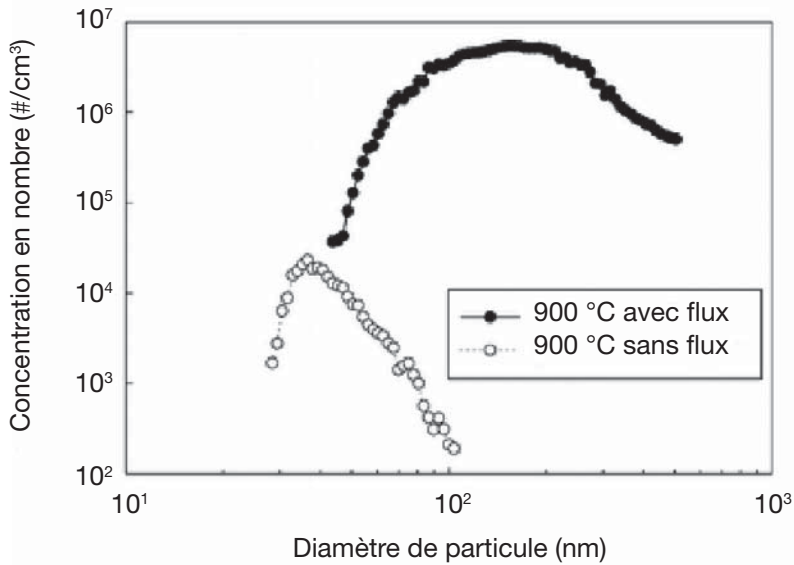


Figure 2.20. Modification de la distribution granulométrique en nombre de l'aérosol formé, lié à la présence ou non d'un agent fluxant lors du soudage. D'après Zimmer (2002).

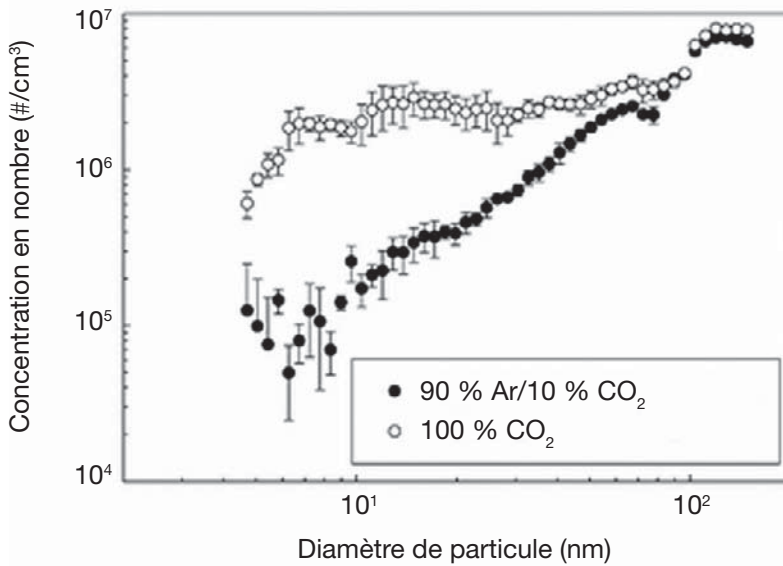


Figure 2.21. Effet de la composition du flux gazeux sur la distribution granulométrique en nombre de l'aérosol formé. Procédé de soudage à l'arc sous protection gazeuse (MIG). D'après Zimmer (2002).

Du fait de la présence de PUF en grand nombre dans les fumées de soudage, les doses délivrées aux sites de dépôt que sont les régions extrathoracique et alvéolaire (voir chapitre 3.1) peuvent être relativement importantes. Si de nombreuses études ont été conduites sur les effets, principalement d'ordre respiratoire, associés à l'inhalation des fumées de soudage, très peu sont disponibles pour ce qui concerne des effets non respiratoires, en particulier neurologiques (Antonini, 2003), question débattue notamment à propos du manganèse (Antonini et coll., 2006). Les quelques études ayant indiqué une possible association entre des effets neurologiques et une exposition par inhalation aux fumées de soudage sont peu précises dans la caractérisation de l'exposition. Or des centaines de milliers de soudeurs sont exposés de par le monde aux fumées de soudage. Des travaux sont nécessaires pour préciser au mieux les caractéristiques physicochimiques de la fraction ultra-fine des aérosols de soudage.

Peters et coll. (2006) ont réalisé une cartographie de concentrations en nombre (cm^{-3}) et en masse (mg/m^3) des particules afin de caractériser l'aérosol ultra-fin dans un grand atelier ($100\,000\text{ m}^2$) de fabrication et de d'assemblage de moteurs. Les concentrations mesurées étaient comprises entre environ 10^5 cm^{-3} et 10^6 cm^{-3} , soit en moyenne 15 fois celles à l'extérieur de l'atelier, quelle que soit la saison (hiver/printemps). Les concentrations en nombre les plus élevées ont été observées à proximité des systèmes de chauffage à gaz de l'air, en hiver ; les niveaux atteints étaient fonction de la technologie mise en œuvre. Les concentrations en masse étaient relativement faibles et non corrélées avec les précédentes. Les auteurs ont conclu que, dans la mesure où des effets néfastes sur la santé seraient attribuables à des expositions aux PUF, une réglementation basée sur la masse ne serait pas adaptée à la protection des travailleurs. Dans cet atelier, la variabilité spatiale élevée a été attribuée à l'existence de plusieurs sources de PUF. En revanche, les mesures effectuées sur plusieurs jours successifs, en hiver, ont montré une variabilité temporelle faible, ce qui suggère une longue persistance des PUF dans l'atmosphère de l'atelier et une exposition relativement stable.

Cette étude montre qu'une cartographie couplée à des techniques instrumentales adaptées permet d'obtenir des informations sur la variabilité spatiale et temporelle des PUF et améliore la connaissance des expositions.

La question des PUF peut également se poser lorsque l'approche préventive se révèle insuffisante, comme dans le cas du béryllium, pour lequel l'exposition semble toujours à l'origine d'intoxications chroniques malgré une réduction significative des niveaux de concentration en masse, et une valeur limite d'exposition faible (Kreiss et coll., 1996). Une étude préliminaire a révélé que, dans les zones où le risque était élevé alors que les niveaux de concentration en masse étaient faibles, l'aérosol était caractérisé par une forte proportion de PUF (MacCawley et coll., 2001). Les procédés visés par cette étude concernaient ceux liés à l'élaboration du béryllium, de la poudre d'oxyde de béryllium et d'un alliage cuivre-béryllium. Une deuxième étude (Stefaniak et coll., 2003) a montré que les propriétés physicochimiques des aérosols (surface, nombre, taille et spéciation)

peuvent influencer la biodisponibilité du béryllium. Néanmoins, les connaissances restent insuffisantes pour remplacer de manière certaine la métrique actuelle. Il est donc important que des études complémentaires soient réalisées pour caractériser le plus complètement possible d'un point de vue physique et chimique la fraction ultra-fine de l'aérosol. L'un des domaines possibles est celui de l'industrie de l'aluminium ; dans ce contexte, une étude finlandaise (Thomassen et coll., 2006) a cherché à caractériser les PUF sur un site de fabrication à l'aide de deux techniques : SMPS, et prélèvement par thermophorèse pour analyse en microscopie électronique (MET). Les résultats obtenus à l'aide du SMPS montrent la présence de particules inférieures à 100 nm à des niveaux de concentrations élevés et variables (de 10^4 à environ $5 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$), qui dépendent de l'étape du procédé, l'étape de changement d'anode étant la source principale. Un résultat surprenant est que ces PUF n'ont pas été détectées en microscopie électronique : les auteurs avancent l'hypothèse que la méthode de prélèvement (par thermophorèse) n'était peut-être pas adaptée à ces particules. Finalement cette étude, si elle n'apporte pas d'information suffisante quant aux caractéristiques des PUF émises au voisinage d'un procédé de fabrication d'aluminium, met en évidence l'intérêt de recourir à des techniques métrologiques et analytiques complémentaires ; elle montre aussi que la caractérisation des PUF par microscopie électronique pose de sérieuses questions liées au prélèvement.

Les substances présentes en traces sont souvent ignorées comme source possible d'exposition professionnelle significative. Morris (2004) indique, par exemple, que des expositions au cadmium supérieures aux valeurs limites américaines ont été constatées dans des fonderies non ferreuses, alors que cette substance ne figurait qu'à l'état de traces dans le produit de base, typiquement à des valeurs de l'ordre de 0,0004 %. En termes de prévention, il peut donc être inapproprié de ne pas prendre en compte les éléments traces. Mais cette étude pose la question de la nécessité de caractériser de façon systématique et plus finement les aérosols en y intégrant les PUF dès qu'il y a génération de vapeurs et de fumées.

3.2.2. Procédés mettant en œuvre des lasers et autres techniques de découpe

Le laser est une technique de plus en plus utilisée dans l'industrie et les laboratoires de recherche pour de multiples applications : décapage de surfaces, perçage de métaux et céramiques, gravure de précision sur verres, découpe de divers matériaux y compris plastiques et naturels (cuir), traitements de surface, etc. Les particules émises à la source sont pour l'essentiel largement inférieures à 100 nm (Bruch, 2004 ; Géléoc et Gensdarmes, 2004 ; Ullman et coll., 2003). Par ailleurs, dans un local où le procédé d'oxycoupage plasma était employé, Möhlmann (2005) a mesuré une concentration

moyenne en nombre d'environ $5 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$; l'aérosol était caractérisé par un diamètre modal en nombre compris entre 120 et 180 nm. Compte tenu de l'utilisation grandissante du laser, il apparaît nécessaire que des études de terrain soient réalisées en privilégiant la caractérisation de la fraction ultra-fine de l'aérosol.

3.2.3. Projection thermique

La projection thermique par plasma permet de réaliser des traitements de surface en projetant à vitesse élevée, sur une surface préalablement préparée, de fines particules d'une substance solide, fondue ou ramollie. Une torche à plasma fait fondre la poudre métallique ou céramique puis la projette sur la surface, où elle se solidifie. Les applications, très nombreuses, impliquent une grande variété de revêtements : moteurs d'avions ou automobiles, génératrices à turbines, outils, vannes, pompes, essieux, engrenages, roulements à billes, etc. À notre connaissance, aucune étude n'a caractérisé l'aérosol émis autour d'un procédé de projection plasma.

Sur un procédé voisin, l'étude expérimentale de Rendall et coll. (1994) a concerné la projection à arc de particules de nickel pour traiter des surfaces, suite à la mort d'un homme de 38 ans qui avait été exposé durant 1 h 30. Les mesures effectuées par prélèvements sur filtres et analyses en microscopie électronique ont montré que l'aérosol émis était essentiellement caractérisé par des particules d'environ 50 nm. Cette étude relève plus de l'observation que d'une réelle caractérisation, car seule la microscopie électronique a été mise en œuvre et aucun dispositif de prélèvement spécifique à ce type d'analyse n'a été employé. Comme il n'existe pas à notre connaissance d'étude équivalente, ce type de procédé devrait faire l'objet d'examens complémentaires.

3.2.4. Combustion

La combustion conduit, au travers de réactions de nucléation/condensation, à des PUF en grand nombre (Wake et coll., 2002). Si la granulométrie des particules primaires a généralement un diamètre modal inférieur à 50 nm, dépendant peu des conditions d'émission, la distribution granulométrique finale est liée à l'occurrence ou non de mécanismes tels que la coagulation (Vincent et Clément, 2000). Une étude exploratoire a été réalisée pour caractériser l'aérosol émis lors du fumage de charcuteries. La figure 2.22 montre les distributions granulométriques mesurées à l'aide de deux techniques spécifiques (SMPS et ELPI) en parallèle. L'aérosol formé est caractérisé par une distribution en nombre submicronique et bi-modale. Le mode le plus fin est inférieur à 100 nm.

Toujours dans le domaine agroalimentaire, Möhlmann (2005) a effectué des mesures dans une boulangerie industrielle. Les concentrations en nombre pouvaient atteindre

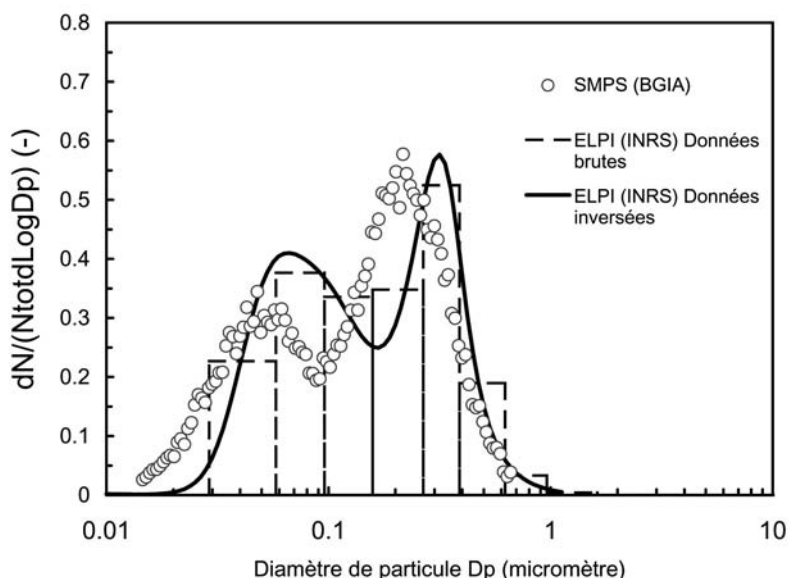


Figure 2.22. Distributions granulométriques mesurées dans un fumier de charcuterie. Mesures effectuées à l'aide d'une technique SMPS et ELPI. D'après Witschger et coll., 2005.

$6,4 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$ et le diamètre modal des distributions en nombre était inférieur à 100 nm. Il n'est pas spécifié s'il s'agissait de particules de farine ou bien si la fraction ultra-fine était, par exemple, liée aux particules émises par les fours ; par ailleurs, aucune caractéristique du local de travail visité n'est précisée.

3.2.5. Émissions particulaires diesels

Les fumées des moteurs diesels sont un mélange complexe de polluants en phases vapeur et particulaire (voir propriétés toxicologiques, chapitre 6, point 2). Ce n'est que depuis peu que ce type d'émissions commence à être caractérisé en termes de fraction ultra-fine. Les études présentées ci-après sont à notre connaissance les seules publiées à ce jour.

Wheatley et Sahra (2004) ont mené en Angleterre une étude sur la caractérisation des expositions aux émissions diesels dans plusieurs dépôts de distribution de liquides agroalimentaires. En parallèle aux méthodes classiques (mesure de la fraction alvéolaire de l'aérosol ambiant et analyse du carbone élémentaire et organique, mesure des HAP, du CO_2 et CO), les auteurs ont utilisé un CNC pour mesurer l'évolution de la concentration en nombre des particules de la gamme submicronique. Les mesures ont été réalisées en été dans des hangars (zone non-fumeur) à proximité des zones de chargement

des camions. Aucun des hangars visités ne disposait de systèmes de ventilation ni d'air conditionné. Les niveaux de concentrations relevés en PUF variaient beaucoup, entre $5 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-3}$ et $2 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$ et, temporairement, la concentration pouvait excéder la limite de l'instrument ($> 5 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$). Les auteurs n'ont noté aucune corrélation significative avec les autres mesures, sauf pour les HAP ($R^2 = 0,85$).

Plus récemment, Ramachandran et coll. (2005) ont mené une étude visant à caractériser l'exposition aux particules diesels chez trois groupes de salariés d'une société de transport urbain. Pour ces trois groupes, trois types de mesures ont été effectuées : 1) concentration en masse par échantillonnage du carbone élémentaire (CE, $\mu\text{g}/\text{m}^3$) ; 2) concentration en surface à l'aide d'une technique de mesure de charge (LQ1-DC et PAS2000 ; voir point 1.2) ; 3) concentration en nombre à l'aide d'un compteur à noyaux de condensation (CNC). Dans certains cas, des mesures de granulométrie ont été effectuées à l'aide d'une technique SMPS. Le tableau 2.X résume les résultats pour les différentes métriques (masse, surface et nombre) et les trois groupes (conducteurs de bus, mécaniciens et personnels de parking). Les mesures effectuées à l'aide du SMPS montrent que l'aérosol est caractérisé par un diamètre médian inférieur à 100 nm ; elles suggèrent également que, suivant la métrique utilisée, le classement relatif des groupes peut être modifié.

Même si l'on ignore actuellement quelle métrique est la plus pertinente pour évaluer les effets des PUF sur la santé, il semble évident que le choix de la métrique affectera le classement des groupes considérés. Au-delà de la caractérisation des expositions, cette étude montre aussi qu'il est possible de mesurer des niveaux d'exposition faibles pour les trois métriques masse, surface ou nombre.

Groupes	Conducteurs de bus	Mécaniciens	Personnel de parking
Concentration en masse ^a (CE, $\mu\text{g}/\text{m}^3$)	$2,0 \pm 0,21$	$3,9 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,11$
Concentration en surface ^b (LQ1-DC, $\mu\text{m}^2/\text{m}^3$)	$65 \pm 0,6$	$91 \pm 0,4$	$148 \pm 2,8$
Concentration en nombre ^c (CNC, cm^{-3})	-	$3,1 \pm 0,9 (\times 10^4)$	$6,6 \pm 1,4 (\times 10^4)$

Tableau 2.X. Résultats résumés pour les différentes métriques (masse, surface et nombre) et les trois groupes d'individus (extrait du tableau 2 de Ramachandran et coll., 2005). Valeurs moyennes ± 1 écart-type. ^a Moyenne sur la durée du poste ; ^b moyenne sur 10 s ; ^c moyenne sur 1 min.

La question de l'exposition professionnelle aux PUF émises par des moteurs ne concerne pas uniquement les personnes travaillant dans des entreprises de transport mais aussi, par exemple, celles travaillant dans des tunnels ou des mines. Au sein d'un tunnel routier à fort trafic, l'aérosol est généralement caractérisé par la présence en grand nombre de particules de taille inférieure à 100 nm (Gidhagen et coll., 2004). Le personnel d'intervention y est donc exposé lors de travaux d'entretien.

À titre anecdotique, il est étonnant qu'une étude dédiée à la caractérisation de l'exposition professionnelle des routiers aux particules (Lee et coll., 2005) ne prenne en compte ni l'approche conventionnelle d'évaluation de l'exposition (mesure de la fraction inhalable, thoracique ou alvéolaire), ni n'incorpore d'instrumentation spécifique à la mesure des PUF alors que le contexte l'implique. Il est à souligner pour le premier point que la référence considérée est la fraction $PM_{2,5}$ qui – il faut le rappeler – n'a pas été définie pour caractériser un effet sur la santé mais la source (Vincent, 2005). Un tel choix pourrait être dommageable à de futures études épidémiologiques en milieux professionnels, qui devront réévaluer les données d'exposition à partir d'hypothèses relatives aux effets sur la santé.

3.2.6. Dégradation thermique de substances non métalliques

La dégradation thermique de polymères et de matières plastiques peut également conduire à la formation de PUF en grand nombre. De nombreux travaux ont été réalisés sur les isocyanates en raison de leurs effets sur la santé. Pourtant, des interrogations majeures subsistent, notamment sur la caractérisation de la phase particulaire formée lors de la fabrication de mousses polyuréthane. Melin et coll. (2001) ont caractérisé la fraction particulaire émise lors de la dégradation thermique de mousses polyuréthane, en mettant l'accent sur la composante ultra-fine, ce qui n'avait jamais été fait. La figure 2.23 montre des exemples de distributions granulométriques obtenues lors de la dégradation thermique à 300 °C.

Les mesures effectuées à différentes températures (250 à 300 °C) démontrent la présence d'un aérosol ultra-fin. Les concentrations en nombre étaient de l'ordre de 10^6 cm^{-3} et les diamètres médians compris entre environ 30 et 50 nm. Les aérosols étaient peu polydispersés, les écart-types géométriques étant compris entre 1,5 et 1,8. Puisque de nombreux produits contiennent des isocyanates (plastiques, mousses, peintures, adhésifs, élastomères) et peuvent être soumis à des contraintes thermiques provoquant de fortes émissions de PUF, il semble primordial que la caractérisation de la fraction ultra-fine de l'aérosol soit un élément majeur des études d'évaluation des expositions professionnelles.

Dans ce même domaine de la dégradation thermique de substances non métalliques, on peut citer une étude finlandaise, apparemment anecdotique mais qui pourrait concerner

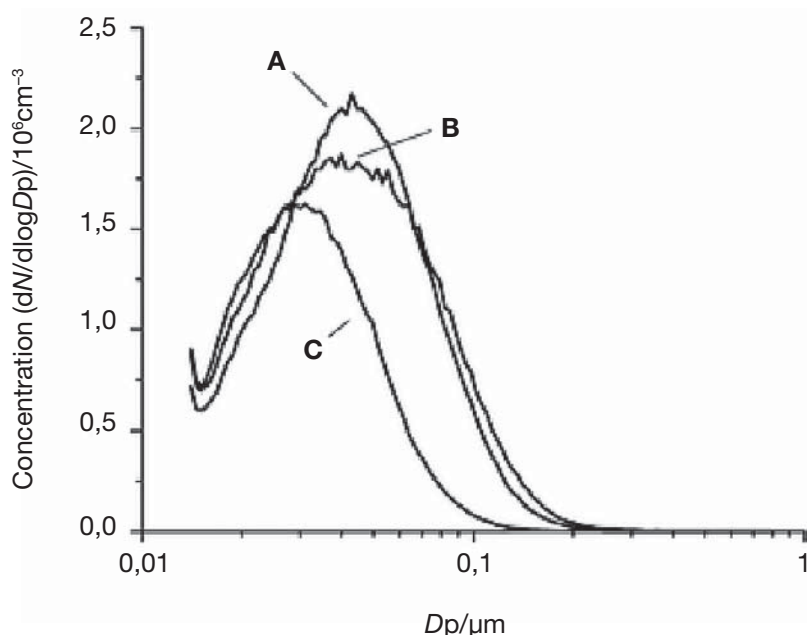


Figure 2.23. Exemples de distributions granulométriques d'aérosols obtenus lors de la dégradation thermique à 300 °C de mousses polyuréthane. Les courbes A, B et C correspondent respectivement à un prélèvement effectué dans l'air ambiant, à un prélèvement effectué dans de l'air sec filtré et à une mousse sans retardateur de flamme. D'après Melin et coll. (2001), figure 2.

une population non négligeable durant la période hivernale, sur la formation de PUF lors de fartage de skis (Hämeri et coll., 1996).

Plus récemment, la même équipe finlandaise (Hämeri et coll., 2003) s'est intéressée à l'émission de PUF dans un procédé de traitement de surfaces. Dans une première étape, les pièces étaient soumises à un spray de particules solides de polyester de dimensions comprises entre 30 et 60 μm ; dans une deuxième étape, les pièces étaient passées au four entre 180 et 220 °C. Si le spray était la source évidente de particules microniques, le passage dans le four était la source plausible de PUF. Même si le procédé était automatisé, des expositions étaient probables lors de la manipulation des différentes pièces. Les substances évaporées à l'origine de la formation de PUF pouvaient provenir soit des constituants du traitement de surface, soit des graisses utilisées dans les automates du four. Les mesures au niveau des voies respiratoires d'un opérateur montrent une très forte augmentation de l'aérosol inférieur à 150 nm, corrélée à l'activité du procédé et notamment du four. L'aérosol était caractérisé par un mode voisin de 50 nm et une concentration maximale autour de 10^5 cm^{-3} .

Ces quelques données montrent qu'il est nécessaire d'approfondir la question des émissions de PUF au voisinage des procédés entraînant une dégradation thermique de

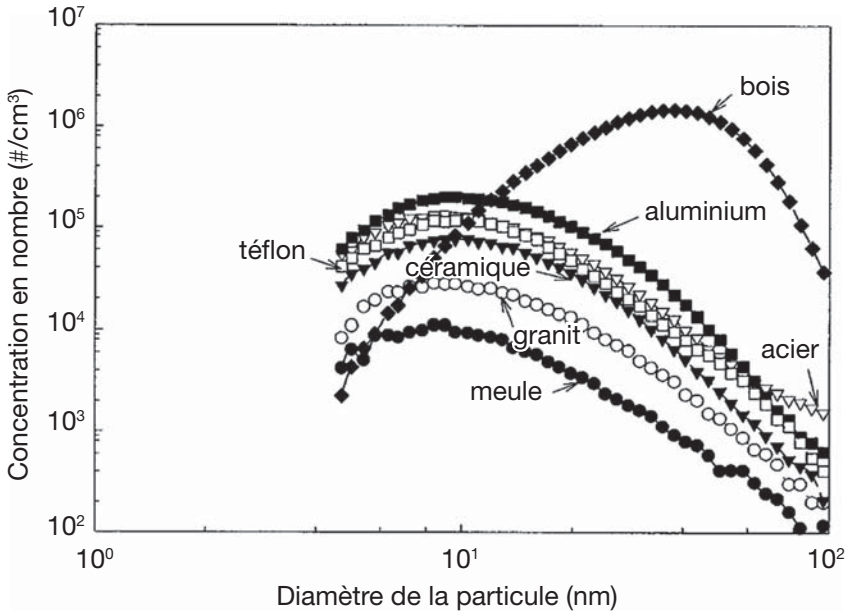


Figure 2.24. Distributions granulométriques sur la plage inférieure à 100 nm de l'aérosol émis par la meule seule et lors du meulage de différents substrats. (Figure 5 de Zimmer et Maynard, 2002).

substances non métalliques, comme l'application à chaud de résines ou de cires, la dégradation de polymères ou de matières plastiques. En effet, dès lors que des substances sont vaporisées, des particules de taille nanométrique peuvent être émises (Vincent et Clement, 2000).

3.2.7. Procédés mécaniques

On pense souvent que les procédés mécaniques comme le meulage ou le ponçage ne dispersent que des particules de taille micronique. Pourtant, une étude relative au meulage à main révèle la présence de PUF, qui peuvent constituer une fraction non négligeable de l'aérosol total (Maynard et Zimmer, 2002 ; Zimmer et Maynard, 2002). Cette étude a consisté à caractériser, dans une chambre d'essai, l'aérosol émis lors du meulage de pièces de compositions différentes (granit, téflon, aluminium, acier, bois, céramique). Diverses techniques granulométriques ont été mises en œuvre pour caractériser l'aérosol sur une gamme de tailles comprise entre quelques nanomètres et quelques dizaines de micromètres. La figure 2.24 montre les distributions observées sur la plage inférieure à 100 nm pour les différents substrats. En l'absence de substrat, l'outil seul est à l'origine de PUF, sans doute émises directement par le moteur, mais à des niveaux de concentration bien inférieurs à ceux mesurés lors du meulage. D'après les auteurs, ces particules se formeraient par combustion ou évaporation (puis

condensation) des substrats. Cette étude s'est attachée à caractériser les particules uniquement d'un point de vue physique (taille, concentration) ; il semble nécessaire d'aller plus loin sur le plan morphologique comme pour l'analyse chimique, pour mieux caractériser l'exposition et mettre en place des actions de prévention adaptées.

En liaison avec les procédés mécaniques, une étude préliminaire (Michalek et coll., 2003) a également montré la présence de PUF dans un brouillard de fluide de coupe lors d'une opération d'usinage. Les mesures effectuées à l'aide d'un SMPS révèlent un mode de la distribution en nombre autour de 200 nm. Les auteurs suggèrent que la formation de PUF lors de ce type d'opérations soit plus largement étudiée.

3.3. Fabrication et manipulation de matériaux connus à structure nanométrique

Cette partie s'intéresse aux émissions lors de la fabrication ou de la manipulation de matériaux connus et de structure nanométrique. Pour l'essentiel, il s'agit de substances produites en fortes quantités au niveau mondial, notamment le noir de carbone, le TiO_2 , les silices et alumines (plusieurs dizaines à plusieurs millions de tonnes), et aux applications industrielles nombreuses : par exemple noirs de carbone dans les pneus ; TiO_2 ultra-fin dans les produits solaires, les peintures, les plastiques ; silices et alumines ultra-fines dans la fabrication de céramiques, comme agent polissant, renforçant, etc. Tous ces produits sont de plus en plus employés sous forme ultra-fine du fait de propriétés liées à la faible taille des particules primaires, comme les propriétés photo-catalytiques du TiO_2 ultra-fin pour la dégradation des polluants. La grande surface spécifique offerte par ces poudres ultra-fines est une caractéristique également recherchée.

Le lecteur intéressé est invité à consulter différentes publications récentes sur les procédés et applications, par exemple Aitken et coll. (2004), Luther (2004) ou Ostiguy et coll. (2006).

La figure 2.25 montre une particule de SiO_2 examinée au microscope électronique à balayage. Elle a été collectée sur une membrane nucléporeTM par filtration liquide d'une suspension. On peut en voir le caractère nanostructuré : il s'agit en fait d'un agglomérat de particules primaires inférieures à 50 nm et présentant une morphologie de type fractale.

D'une façon générale, les agglomérats qui composent les poudres ultra-fines sont composés de particules primaires dont les tailles (de quelques nm à plusieurs dizaines de nm) et traitements de surface peuvent être très différents, y compris pour une même substance. Les poudres ultra-fines (ou encore « poudres nanostructurées ») peuvent également présenter des masses volumiques allant de quelques g/l à plusieurs centaines

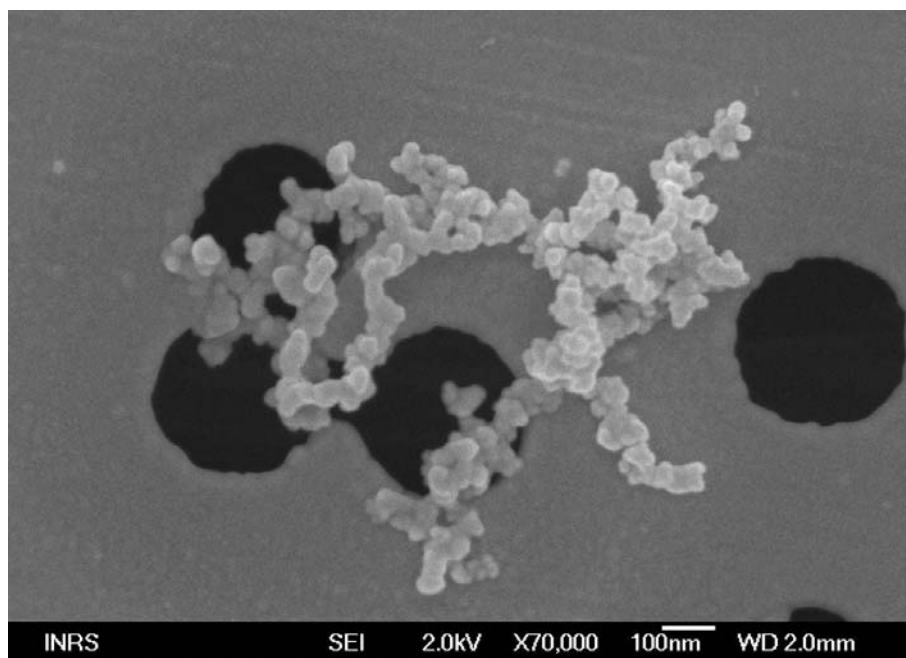


Figure 2.25. Exemple d'une particule nanostructurée de SiO_2 amorphe. Prélèvement sur membrane nuclépore™ par filtration liquide d'un échantillon brut ; image obtenue en microscopie électronique à balayage. ©Rastioix/INRS.

de g/l. Enfin, ces poudres peuvent aussi présenter une cohésion et une coulabilité différentes. Ces divers paramètres jouent un rôle dans leur propension à former un aérosol.

Des expositions sont possibles s'il peut se produire un transfert direct des particules à l'air (« mise en suspension ») : chute de poudres, exposition à l'air d'un dépôt, vibration d'une surface contaminée... situations retrouvées dans de nombreux domaines tels l'électronique, l'agroalimentaire, la pharmacie, le nucléaire... (Witschger, 1999).

Les particules en contact forment généralement des agglomérats sous l'action de forces dont les plus fortes sont celles dites de Van der Waals, agissant à courte distance. La mise en suspension s'effectue alors sous cette forme, et non en particules individualisées. Cependant, pour un mode donné, la mise en suspension résulte de la compétition entre adhérence et forces aérodynamiques ou de cisaillement. De nombreux paramètres entrent en jeu : taille, forme, état de charge des particules, énergie transmise... La question de la mise en suspension d'aérosols à partir de poudres est donc difficile du point de vue théorique (Alloul, 2002). Au niveau européen, le concept de « propension des poudres en vrac à former un aérosol » (*dustiness of bulk materials*) a été développé et appliqué aux matériaux pulvérulents. Un index spécifique est évalué à partir de mesures sur l'aérosol créé par l'agitation de la poudre ; la procédure d'essai fait l'objet d'une norme européenne (AFNOR, 2005). Celle-ci décrit deux méthodes de mise en

suspension : agitation dans un tambour en rotation, ou chute libre dans un conduit vertical. Les concentrations des aérosols formés sont caractérisées suivant les fractions inhalable, thoracique et alvéolaire. Douze matériaux de référence, choisis pour représenter diverses combinaisons de distributions granulométriques, de forces de cohésion et de forces électrostatiques, ont été évalués suivant les deux méthodes (SMT4-CT96-2074, 2000). Toutefois, et c'est un point important, il n'existe pas d'information publiée sur l'utilisation de cette méthode, ou d'étude plus fondamentale sur des poudres nanostructurées. Des études complémentaires seraient donc très utiles en vue du contrôle des émissions et des expositions lors de la manipulation de poudres nanostructurées dans les laboratoires de recherche et développement ou dans certaines industries.

Les situations concernées sont par exemple le remplissage de sacs dans les unités de conditionnement ou leur vidange chez les utilisateurs, sans oublier les opérations de nettoyage ou de maintenance ou encore des situations accidentelles comme des fuites autour de procédés normalement confinés.

À ce jour et à notre connaissance, seules deux études expérimentales ont eu pour objectif de caractériser l'exposition lors de fabrication ou de manipulation de matériaux nanostructurés.

La première, exploratoire (Wake et coll., 2002), a évalué dans divers sites en Angleterre l'aérosol autour de différents procédés (mettant en jeu noir de carbone, TiO_2 , fabrication de nickel ou de métaux précieux sous forme de poudre) à l'aide d'une technique SPMS et/ou d'un CNC. Les mesures ont généralement été réalisées au cours d'une seule journée. Aucune précision complémentaire n'est donnée. Les résultats présentés et l'analyse qui en est faite ne permettent pas de discerner entre le procédé et le bruit de fond de l'aérosol ambiant. Les auteurs concluent à la nécessité de conduire des études plus complètes et spécifiques.

L'étude la plus complète relative à la catégorie 2 est due à Kuhlbusch et coll. (2004) ; elle a concerné la production de noir de carbone sur trois sites en Allemagne. L'objectif était de réaliser, à l'aide de techniques de mesures complémentaires, une caractérisation la plus précise possible de l'aérosol à l'ensachage. Il s'agit souvent de l'opération la plus « dispersante » avec, dans ce cas, des sacs de petite (25 kg) ou de grande taille (environ 1 000 kg).

Les différents types de mesures étaient : 1) la concentration moyenne en masse des fractions PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$ et PM_{10} et l'analyse du carbone élémentaire et organique ; 2) l'évolution de la concentration en masse à l'aide d'une technique TEOM ; 3) l'évolution de la distribution granulométrique en nombre à l'aide d'une technique SMPS. Une attention particulière a été apportée à la stratégie de mesure dans le but d'extraire du bruit de fond l'éventuelle signature de l'aérosol émis par l'opération. Pour chacune des techniques TEOM et SMPS, deux instruments similaires ont été utilisés en

parallèle, l'un localisé à proximité de l'opération et l'autre en un point de comparaison, où l'aérosol pouvait être considéré comme le bruit de fond.

La figure 2.26 compare la distribution en nombre obtenue durant le remplissage des sacs de grande taille à celle mesurée pendant l'arrêt de travail immédiatement après. L'axe de droite des ordonnées (figure 2.26) donne le rapport des deux distributions ; celles-ci présentent deux modes distincts, le premier autour de 30 à 50 nm, l'autre supérieur au micromètre. Le rapport maximal des concentrations se situe autour de 60.

Cette mesure a été répétée, et un accroissement de la concentration sur la gamme 30 à 50 nm a pu être observé. On aurait pu conclure que l'ensachage est à l'origine de la présence de PUF et que ces PUF sont du noir de carbone ; une analyse plus fine du procédé a fait apparaître que, lors de cette opération, des chariots élévateurs circulaient à proximité, ces chariots étant alimentés par des moteurs de type diesel ou à gaz. La figure 2.27 compare cette fois la distribution en nombre obtenue lors du passage d'un chariot fonctionnant au gaz propane à celle mesurée lors de son arrêt ; on observe une augmentation des particules sur la gamme autour de 30 nm, ainsi que pour les particules microniques. En définitive, la présence des PUF est attribuée à l'émission du moteur du chariot, les particules les plus grosses pouvant provenir de la mise en suspension des particules déposées sur le sol ou sur les différentes surfaces du chariot.

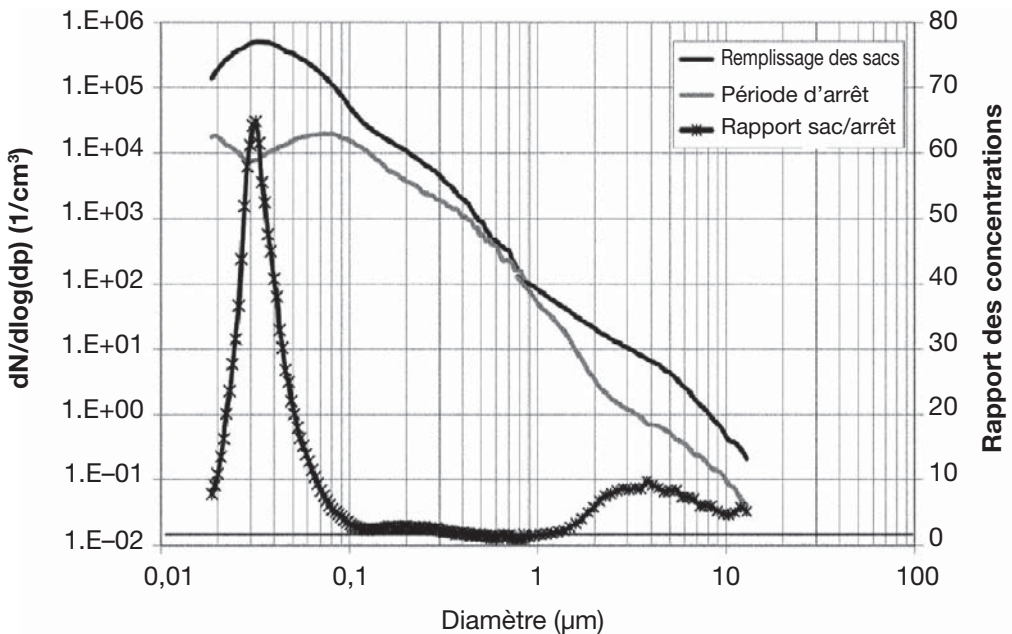


Figure 2.26. Comparaison des distributions en nombre mesurées lors du remplissage des sacs et durant la période d'arrêt située immédiatement après. (Figure de Kuhlbusch et coll., 2004.)

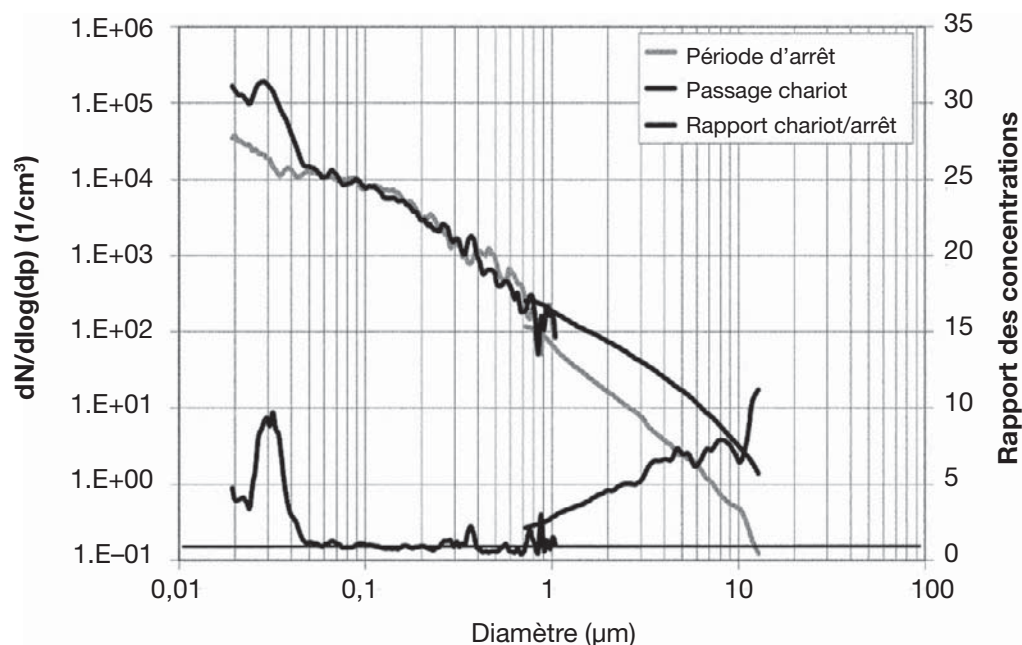


Figure 2.27. Comparaison des distributions en nombre mesurées lors du passage d'un chariot à moteur et durant la période d'arrêt située immédiatement après. (Figure de Kuhlbusch et coll., 2004.)

Sur l'un des trois sites visités lors de l'étude, la présence de PUF a pu être également attribuée à l'émission de chauffages à gaz. Conclusions tirées de cette étude :

- aucune émission de PUF n'a pu être reliée à une opération de remplissage de sacs par du noir de carbone ;
- la stratégie de mesurage est fondamentale pour pouvoir conclure de façon certaine ;
- il est important de réaliser des mesures avec plusieurs instruments du même type.

Cependant, cette étude est la seule dans ce domaine : il faut donc être prudent avant de généraliser à d'autres sites semblables. Par ailleurs, il s'agissait seulement de sites de production ; il n'est pas impossible que l'aérosol puisse être différent lors de la vidange de sacs chez les utilisateurs. En effet, l'émission dans l'air dépend d'un grand nombre de facteurs liés au procédé lui-même, aux caractéristiques de la poudre, aux paramètres environnementaux, etc. Enfin, cette étude s'est limitée à une signature de la concentration en nombre ; il conviendrait qu'elle puisse être étendue à d'autres signatures, notamment sur la concentration en surface.

En ce qui concerne le TiO_2 , le NIOSH (NIOSH, 2005) a publié un bulletin dans lequel il recommande une valeur limite de moyenne d'exposition ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$) pour la fraction ultra-fine de l'aérosol. Actuellement, en France, cette substance dispose de deux valeurs limites de moyenne d'exposition : $5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ pour la fraction alvéolaire, et $10 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ pour la fraction inhalable. Ces valeurs sont respectivement 50 et 100 fois supérieures à

celle proposée par le NIOSH, fondée sur le développement des connaissances toxicologiques (voir chapitre 5, point 2 sur la toxicité du TiO_2). Ce même développement a motivé l'Agence internationale de recherche sur le cancer à faire évoluer la classification du TiO_2 (IARC, 2006), passé de la catégorie 3 à la catégorie 2B, c'est-à-dire potentiellement cancérigène chez l'homme. Le CIRC a également classé le noir de carbone dans la même catégorie 2B.

L'absence de données publiées caractérisant la fraction ultra-fine des particules émises lors de la fabrication ou de la manipulation du TiO_2 , et la modification de sa classification, rendent nécessaires des études visant à caractériser les émissions.

3.4. Fabrication et manipulation de nouveaux matériaux (nanomatériaux)

Les nanotechnologies étudient et développent les techniques de fabrication, de manipulation et d'utilisation de la matière à une échelle proche de celle des molécules pour produire de nouveaux matériaux (Bushan, 2004). Les nanotechnologies, notamment les nanomatériaux, sont une réalité dans plusieurs secteurs (chimie, pharmacie, métallurgie, bâtiment, cosmétique, automobile, transport...) et leur production et utilisation ne feront qu'augmenter dans les années à venir (Académies des sciences, 2004). Mais l'enthousiasme avec lequel les communautés scientifiques et techniques embrassent les nanotechnologies est tempéré par des questions comme celles liées aux risques pour la santé (Lorrain et Raoul, 2004 ; Maynard, 2006 ; AFSSET, 2006).

Le poids économique des nanotechnologies devrait atteindre 1 000 milliards d'euros par an avant 2015, avec des applications qui vont des marchés grand public aux domaines de la sûreté, de la sécurité et de la défense (Roure, 2004). La fabrication et la mise en œuvre de nanomatériaux devraient constituer la plus grande part de ce marché puisque leur impact économique global est estimé à environ un tiers du total. Les secteurs industriels concernés par les fonctionnalités offertes par les nanomatériaux sont nombreux comme l'automobile et les transports, la chimie, l'hygiène et la cosmétique, le bâtiment, la plasturgie, l'électronique, l'industrie des fibres textiles, l'agro-alimentaire, le sport (Luther, 2004 ; SWISS RE, 2004), et deux millions d'employés devraient être directement concernés d'ici à 10 ans (DIGITIP, 2004). Une étude conduite en Angleterre indique qu'environ 2 500 personnes qui travaillent à l'heure actuelle dans les secteurs de la recherche ou dans des entreprises nouvellement créées sont potentiellement exposées aux nouvelles nanoparticules (Aitken et coll., 2004).

Les nanomatériaux sont des matériaux composés en tout ou partie de nano-objets qui confèrent à ces matériaux des propriétés (ou des combinaisons de propriétés) améliorées ou nouvelles (Le Marois et Carlac'h, 2004). Parmi les nano-objets, on distingue généralement :

- les nanoparticules (dont aucune des trois dimensions n'est supérieure à 100 nm) ;
- les nanotubes, nanofibres, nanobâtonnets (dont une des dimensions est supérieure à 100 nm) ;
- les nanofilms (dont deux des dimensions sont supérieures à 100 nm).

Par ailleurs, les nanomatériaux sont habituellement regroupés en trois familles :

- les matériaux nanochargés. Des nano-objets sont incorporés dans une matrice pour lui apporter une nouvelle fonctionnalité ou modifier des propriétés. Les nano-objets peuvent être incorporés lors de la phase d'élaboration du matériau ou par la suite ;
- les matériaux nanostructurés en surface, c'est-à-dire recouverts d'un ou de plusieurs nanofilms superposés formant un revêtement contrôlé qui permet de doter la surface de propriétés déterminées ou de fonctionnalités nouvelles (par exemple l'effet lotus pour les verres), ou bien les matériaux recouverts de nanoparticules ;
- les matériaux nanostructurés en volume qui sont des matériaux dont la structure nanométrique est liée à l'hétérogénéité de composition, la porosité... Un matériau peut, par exemple, devenir moins fragile parce que les fractures ne se propagent pas de la même façon du fait de la nanostructuration (par rapport à un matériau dont la structure serait micrométrique).

Les procédés d'élaboration des nanomatériaux sont classés en trois grandes catégories :

- procédés chimiques : dépôt chimique en phase vapeur (*chemical vapor deposition*), réaction en milieu liquide, sol-gel... ;
- procédés physiques : évaporation/condensation, ablation laser, décharge plasma... ;
- procédés mécaniques : mécanosynthèse, consolidation et densification.

La stabilisation de la croissance en taille est une étape clé lors la fabrication des nanoparticules. Du fait de leur grande réactivité, les nanoparticules ont tendance à former très rapidement des agglomérats ou agrégats, ce qui peut modifier considérablement la propriété – ou la combinaison de propriétés – recherchée. Cette stabilisation s'effectue suivant différentes approches comme l'inclusion dans une matrice ou la dispersion dans un liquide. Ainsi, les nanoparticules peuvent être incluses dans une matrice solide, un gel, une suspension, mais également former une poudre nanostructurée ou nanopoudre.

La mécanosynthèse permet d'obtenir par broyage à haute énergie des nanopoudres de particules métalliques ou des oxydes (Gaffet et Le Caër, 2004). De telles poudres sont également obtenues par pyrolyse laser (Luther, 2004 ; Cao, 2004).

Il semble que la très grande majorité des procédés de fabrication emploie des systèmes clos et qu'un opérateur n'est exposé qu'en cas d'accident ou de fuite. Cela demanderait à être confirmé par une étude de filière dans les différents secteurs concernés. Dans l'état actuel des connaissances, on peut supposer que c'est pendant des opérations de transfert,

de conditionnement et d'utilisation (dans l'industrie cliente) qu'une exposition est la plus probable (Aitken et coll., 2004).

Lorsqu'une nanopoudre est mise en œuvre, des particules sont mises en suspension dans l'air et transférées dans l'environnement proche d'un opérateur. La dispersion dans l'air en champ proche est fonction essentiellement du mode d'agitation, de l'énergie transmise mais aussi de la nature même de la poudre. À l'heure actuelle, on ne sait rien des caractéristiques de l'aérosol ultra-fin (distribution granulométrique, forme des particules, concentration, etc.) qui serait mis en suspension en pareille situation.

A priori, les nanoparticules incluses dans une matrice solide ne sont émises que si cette dernière est soumise à une énergie (thermique ou mécanique) suffisante, lors d'une découpe, d'un ponçage, d'un nettoyage au laser. De tels procédés émettent des PUF avec des matériaux classiques ; qu'en est-il avec des nanocomposites ?

De même, les suspensions liquides de nanoparticules ne peuvent contribuer de façon directe à une exposition par inhalation, sauf s'il y a formation d'un aérosol de fines gouttelettes dans lesquelles seraient incluses des nanoparticules. On peut trouver des procédés où ces suspensions sont séchées, permettant ainsi un contact direct des nanoparticules avec l'air. Il y a là aussi un champ d'investigation qu'il conviendrait d'aborder.

Le tableau 2.XI présente les différentes sources de particules nanostructurées liées aux émissions lors de la fabrication et de la manipulation de nanomatériaux.

Émissions liées aux nouveaux matériaux (nanomatériaux)	
Groupe d'aérosol	Sources potentielles
Nanomatériaux	Production et manipulation de nanotubes de carbone Production et manipulation de (nouvelles) nanoparticules et particules nanostructurées Production et manipulation de poudres nanostructurées en mécanosynthèse Manipulation et utilisation de poudres nanostructurées Sprays de suspension de nanoparticules Séchage ou calcination de suspension de nanoparticules Usinage et ponçage de nanomatériaux ou nanocomposites Perçage de précision de nanomatériaux ou nanocomposites Polissage fin ou abrasion de nanomatériaux ou nanocomposites Opérations diverses liées au recyclage des déchets contenant des nanomatériaux ou nanocomposites ...

Tableau 2.XI. Sources potentielles de PUF liées à la fabrication et la manipulation de nouveaux matériaux (nanomatériaux).

À notre connaissance, il n'existe pas d'étude publiée caractérisant l'exposition dans l'une des situations énumérées dans ce dernier tableau, à l'exception d'une concernant la fabrication de nanopoudre par procédé plasma (Chein et coll., 2005) et d'une sur les nanotubes de carbone (NTC ; Maynard et coll., 2004).

Chein et coll. (2005) ont mesuré en parallèle la concentration en nombre des particules au voisinage d'un procédé pilote de fabrication de nanopoudres par plasma, en conditions de marche et d'arrêt, ainsi qu'en ambiance. L'instrument employé n'est pas indiqué. Les niveaux de concentrations rapportés ne permettent pas de conclure sur l'émission de PUF, et les auteurs ne tirent aucune conclusion. Cette étude n'est pas exploitable dans le cadre de cet ouvrage.

L'étude métrologique du NIOSH sur les NTC (Maynard et coll., 2004) a inclus deux types de lieux, d'une part divers sites de fabrication de NTC mono-feuillet non purifiés (dont la NASA et la Rice University), d'autre part un laboratoire où était mis en œuvre un système d'agitation expérimental.

Les mesures sur site ont été réalisées en confinant temporairement la zone de manipulation. Différentes méthodes ont été déployées pour caractériser l'évolution temporelle de la concentration en nombre de la fraction submicronique (avec un CNC) ainsi que de la concentration en masse (à partir des données d'un compteur optique de particules). Des prélèvements sur filtre ont également été effectués (échantillonneur de type cassette 25 mm ; Vincent, 1995). La concentration en NTC a été déduite des concentrations des catalyseurs Fe et Ni collectés sur le filtre, en considérant qu'ils participaient à hauteur de 30 % de la masse totale des NTC.

En laboratoire, une technique SMPS a été mise en œuvre afin de caractériser également la granulométrie. Les mesures sur banc d'essai ont montré qu'au-delà d'un certain degré d'agitation, un aérosol ultra-fin pouvait être mis en suspension (figure 2.28).

En revanche, les mesures sur site ont montré que les concentrations massiques atmosphériques restaient très faibles et que leurs variations n'étaient pas corrélées avec la manipulation des nanotubes. Une source de PUF mise en évidence lors de ces essais était l'utilisation d'un aspirateur lors des opérations de nettoyage...

La concentration moyenne la plus forte en NTC estimée à partir des prélèvements sur filtre était de 53 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, les auteurs estimant qu'il s'agissait là du maximum possible. L'exposition cutanée était significative. Cette étude ne concerne qu'un seul type de nanotubes et fournit peu d'indications sur les caractéristiques de l'aérosol ; elle ne constitue qu'une première approche et ne peut être généralisée. Il est urgent de réaliser des mesures plus complètes, en mettant l'accent sur la taille, la forme, la structure et la composition des particules émises.

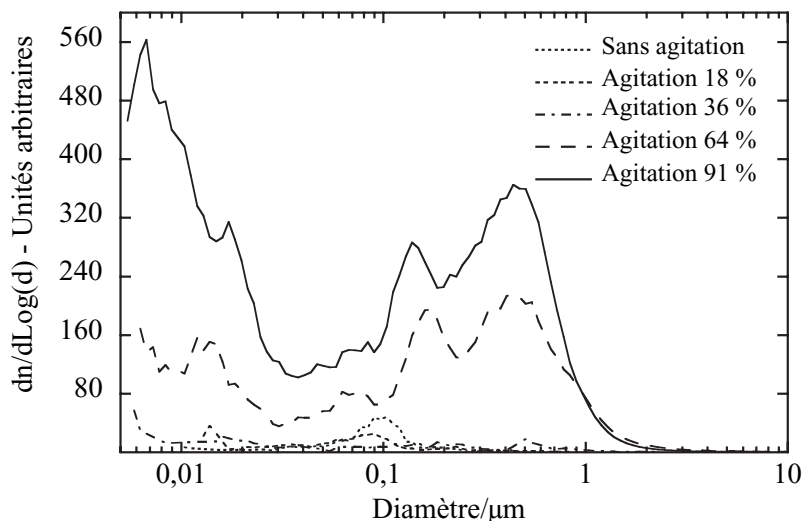


Figure 2.28. Aperçu des distributions granulométriques observées en laboratoire pour différents degrés d'agitation de nanotubes de carbone (HiPCO®). (Figure 2 de Maynard et coll., 2004.)

Conclusion

L'exposition professionnelle aux PUF est possible pour tous les procédés de fabrication et de manipulation des matériaux nanostructurés. La nature, le niveau et la probabilité de cette exposition vont sans doute beaucoup différer en fonction du procédé et de l'étape du procédé.

Cet état des lieux, bien que non exhaustif, indique que des études et des recherches devraient être conduites sur les points suivants :

- le besoin à court terme pour la caractérisation des PUF se situe surtout dans le domaine de la fabrication et de la manipulation des matériaux nanostructurés des catégories 2 (poudres ultra-fines) et 3 (nanotubes de carbone, nanoparticules, nanocomposites) ;
- en ce qui concerne la catégorie 1 (PUF issues d'émissions secondaires), il est important de poursuivre l'enquête sur le béryllium, et plus généralement sur les éléments traces. Ce type d'études demande de coupler la métrologie des aérosols à l'analyse chimique de traces ;
- toujours dans le domaine des émissions secondaires, on sait encore peu de choses sur les procédés mettant en œuvre des lasers ou entraînant une dégradation thermique de polymères ou de plastiques ;

- comme cela a été fait en Angleterre par Aitken et coll. (2004), il est nécessaire de déterminer les populations exposées aux PUF dans les différents secteurs de la recherche (par exemple universités et établissements publics, comme le CNRS) et de l'industrie (pour des entreprises de toutes tailles).

Par ailleurs, il convient de souligner que :

- dans la majorité des situations, les émissions sont fugitives. L'aérosol au voisinage de la source et celui en ambiance peuvent être radicalement différents en termes de granulométrie et de concentration. De même, les conditions d'exposition diffèrent selon qu'on se trouve à proximité immédiate de la source ou à distance (Brouwer et coll., 2004). Ces éléments doivent être pris en compte pour évaluer l'exposition professionnelle ;
- à ce jour, aucune technique instrumentale de caractérisation des PUF (concentration en nombre, en surface, en masse, mesure du diamètre, etc.) n'est « individuelle », c'est-à-dire qu'aucune ne permet de réaliser une mesure au voisinage des voies respiratoires d'un individu. Des efforts considérables doivent être entrepris au plus vite pour combler ce manque.

C'est sans doute en toxicologie que les efforts et les avancées ont été les plus importants (voir notamment les chapitres 4 à 8). Mais ce n'est qu'en couplant toxicologie et métrologie que la vraie nature du risque lié aux PUF pourra être précisée et, par voie de conséquence, que les moyens de prévention adaptés et efficaces pourront être déployés. En attendant, il est nécessaire de prendre des mesures de précaution, et de les ajuster régulièrement au fur et à mesure de l'avancement des connaissances.

Bibliographie

- Abraham JL, Siwinski G, Hunt A (2002). Ultrafine particulate exposures in indoor, outdoor, personal and mobile environments: effects of diesel, traffic, pottery kiln, cooking and HEPA filtration on micro-environmental particle number concentration. *Ann Occup Hyg* **46** (Suppl. 1), 406-411.
- Académie des sciences. Académie des technologies (2004). Nanosciences – Nanotechnologies. Paris, Lavoisier, Techniques et documentation, 480 pages.
- AFNOR (2005). Atmosphères des lieux de travail – Mesure du pouvoir de resuspension dû aux matériaux pulvérulents en vrac – Exigences et méthodes références d'essai. Paris, AFNOR, 24 pages.
- AFSSET (2006). Agence française de sécurité sanitaire de l'Environnement et du Travail. Avis relatif aux effets des nanomatériaux sur la santé de l'homme et sur l'environnement - Saisine Afsset n° 2005/010.
- Aitken RJ, Creely KS, Tran CL (2004). Nanoparticles: An occupational hygiene review. Research Report, HSE Books, Edinburgh, UK, 102 pages.

- Alloul L (2002). *Le réentraînement par écoulement d'air d'une contamination particulaire déposée sur une surface ; application au cas d'un tas de poudre*. Thèse (11/04/2002), université de Paris XII.
- Antonini JM (2003). Health effects of welding fumes. *Crit Rev Toxicol* **33**, 61-203.
- Antonini JM, Santamaria AB, Jenjins NT, Albini E, Luchini R (2006). Fate of manganese associated with the inhalation of welding fumes: potential neurological effects. *Neurotoxicol* **27**, 304-310.
- Brouwer DH, Gijsbers JH, Lurvink WM (2004). Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies. *Ann Occup Hyg* **48**, 439-453.
- Bruch J (2004). Occupational safety and environmental protection in the industrial laser beam ablation process. In : Möhlmann C (éd.) - *Ultrafine aerosols at workplaces*, BIA Report 7/2003e. Workshop, 2004, pp. 139-146.
- Bushan B (2004). Introduction to Nanotechnology. In: Bushan B, editor, *Springer Handbook of Nanotechnology*. Berlin, Allemagne, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-6.
- Cao G (2004). Nanostructures & nanomaterials. Synthesis, Properties & Applications. London, Imperial College Press, 433 pages.
- Chein HM, Huang CC, Chen TM, Chen EKY, Hsu LY, Chen SY (2005). Exposure evaluation of plasma nanopowders manufacture processes. 2nd International Symposium on nanotechnology and Occupational Health, publié dans actes, p. 27.
- Dennekamp M, Howarth S, Dick CA, Cherrie JW, Donaldson K, Seaton A (2001). Ultrafine particles and nitrogen oxides generated by gas and electric cooking. *Occup Environ Med* **58** 511-516.
- Dennekamp M, Mehenni OH, Cherrie JW, Seaton A (2002) Exposure to ultrafine particles and PM2.5 in different micro-environment. *Ann Occup Hyg* **46 (Suppl. 1)**, 412-414.
- DIGITIP (2004). Étude prospective sur les nanomatériaux. Direction générale de l'Industrie, des technologies de l'information et des postes, mai 2004, 112 pages.
- Gaffet E, Begin-Colin S, Tillement O (1998). Nanomatériaux. Innovation 128 S.A, 180 pages.
- Gaffet E, Le Caër G (2004). Mechanical Processing of Nanomaterials. In: Nalwa HS (éd.) – *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. Volume 5, Stevenson Ranch, California, American Scientific Publishers, pp. 91-129.
- Géléoc M, Gensdarmes F (2004) Caractérisation d'aérosols générés par ablation laser de peintures sur béton. Congrès français sur les aérosols, Paris, publié dans actes, pp. XX.
- Gidhagen L, Johansson C, Ström J, Kristensson A, Swietlicki E, Pirjola L, Hansson HC (2004). Model simulation of ultrafine particles inside a road tunnel. *Atmos Environ* **37**, 2023-2036.
- Gijsbers JHJ, De pater AJ, Snippe RJ, Arts JHE (2000). – Ultrafine particles in the workplace. TNO Report V 3045, 58 pages.
- Hämeri K, Aalto PM, Kulmala M, Sammaljarvi E, Sring E, Pihkala P (1996). Formation of respirable particles during ski waxing. *J Aerosol Sci* **2**, 339-344.
- Hämeri K, Gaman A, Hussein T, Räisänen J, Niemelä R, Aalto PP, Kulmala M (2003). Particle concentration in a vertical displacement flow: a study in an industrial hall. *Appl Occup Environ. Hyg* **18**, 183-192.
- Hinds WC (1999). Aerosol Technology. Properties, behavior, and measurement of airborne particles. 2nd edition. John Wiley & Sons Inc, New York, 483 pages.

- Hussein T, Glytsos T, Ondracek J, Dohanyosova P, Zdimal V, Hameri K, Lazaridis M, Smolik J, Kulmala M (2006). Particle characterization and emission rates during indoor activities in a house. *Atmosph Environ* **40**, 4285-4307.
- IARC (2006). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 93. Carbon black, titanium dioxide, talc. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- ISO (2007). Workplace Atmosphere – Ultrafine, nanoparticles and nanostructured aerosols – Inhalation exposure characterization and assessment. Technical report 27628, ISO/TC 146/SC 2, ISO, Genève, 32 pages.
- Kreiss K, Mroz M.M, Newman LS, Martyny J, Zhen B (1996). Machining risk of beryllium disease and sensitisation with median exposures below 2 µg/m³. *Am J Indust Med* **30**, 16-25.
- Kuhlbusch TA, Neumann S, Fissan H (2004). Number size distribution, mass concentration, and particle composition of PM₁, PM_{2.5}, and PM₁₀ in bag filling areas of carbon black production. *J Occup Environ Hyg* **1** 660-671.
- Lee BK, Smith TJ, Garshick E, Natkin J, Reaser P, Lane K, Lee HK (2005). Exposure of trucking company workers to particulate matter during the winter. *Chemosphere* **61**, 1677-1690.
- Le Marois G, Carlac'h D (2004). Les nano-matériaux, au cœur de la galaxie nano. In: *Les nanotechnologies, Réalités industrielles*, février 2004, Annales des mines, édition ESKA, Paris, pp. 65-72.
- Lorrain JL, Raoul D (2004). Nanosciences et progrès médical. Rapport de l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et techniques, Assemblée nationale, mai 2004, n° 1588, 298 pages.
- Luther W (2004). Industrial application of nanomaterials - chances and risks. Technological Analysis. Future Technologies Division of VDI Technologiezentrum GmbH, Düsseldorf, 112 pages.
- MacCawley MA, Kent MS, Berakis MT (2001). Ultrafine beryllium number concentration as a possible metric for chronic beryllium disease risk. *Appl Occup Environ Hyg* **16**, 631-638.
- Maynard A.D (2006). Nanotechnology: assessing the risks. *Nanotoday* **1**, 2-12.
- Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V (2004). Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health, Part A*, **67**, 87-107.
- Maynard AD, Zimmer AT (2002). Evaluation of grinding aerosols in terms of alveolar dose: the significance of using mass, surface area and number metrics. *Ann Occup Hyg* **46**, 663-672.
- Melin J, Spanne M, Johansson R, Bohgard M, Skarping G, Colmsjö A (2001). Characterization of thermally generated aerosols from polyurethane foam. *J Environ Monit* **3**, 202-205.
- Michalek DJ, Hii WWS, Sun J, Gunter KL, Sutherland JW (2003). Experimental and analytical efforts to characterize cutting fluid mist formation and behavior in machining. *Appl Occup Environ Hyg* **18**, 842-854.
- Möhlmann C (2005). Vorkommen ultrafeiner Aerosole an Arbeitsplätzen. *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft* **65**, 11/12, 469-471.
- Morawska L, Zhang JJ (2002). Combustion sources of particles. 1. Health relevance and sources signature. *Chemosphere* **49**, 1045-1058.
- Morris TK (2004). Cadmium exposures at three nonferrous foundries: an unexpected trace source. *J Occup Environ Hyg* **1**, 39-44.

- Mosley RB, Greenwell DJ, Sparks LE, Guo Z, Tucker WG, Fortmann R, Whitfield C (2001). Penetration of ambient fine particles into the indoor environment. *Aerosol Sci Technol* **34**, 127-136.
- NIOSH (2005). NIOSH Current Intelligence Bulletin: Evaluation of Health Hazard and Recommendations for occupational exposure to titanium dioxide. November 22, 2005, draft, 120 pages.
- Ostiguy C, Lapointe G, Ménard L, Cloutier Y, Trottier M, Boutin M, Antoun M, Normand C (2006). Les nanoparticules. Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et en sécurité au travail. Rapport études et recherches R-455, février 2006, 79 pages.
- Peters TM, Heitbrink WA, Evans DE, Slavin TJ, Maynard AD (2006). The mapping of fine and ultrafine particle concentrations in an engine machining and assembly facility. *Ann Occup Hyg*. **50(3)** 249-257.
- Ramachandran G, Paulsen D, Watts W, Kittelson D (2005). Mass, surface area and number metrics in diesel occupational exposure assessment. *J Environ Monit* **7**, 728-735.
- Rendall REG, Phillips JI, Renton KA (1994). Death following exposure to fine particulate nickel from a metal arc process. *Ann Occup Hyg* **38**, 921-930.
- Riesenfeld E, Chalupa D, Gibb FR, Oberdörster G, Gelein R, Morrow PE, Utell MJ, Frampton MW (2000). Ultrafine particle concentrations in a hospital. *Inhalat Toxicol* **12 (Suppl. 2)**, 83-94.
- Rödelsperger K, Brückel B, Barbisan P, Walter D, Weitowitz HJ (2000). The amount of ultrafine particles in welding fume aerosols. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* **60** 79-92.
- Rouquerol F, Luciani L, Llewellyn P, Denoyel R, Rouquerol J (2003). Texture des matériaux pulvérulents ou poreux. Techniques de l'ingénieur, analyse et caractérisation. P1050.
- Roure F (2004). Économie internationale des nanotechnologies et initiatives publiques. In : *Les nanotechnologies, Réalités industrielles*, février 2004, Annales des mines, Édition ESKA, Paris, pp. 5-11.
- Schimberg RW, Ukkonen A (2003). Ultrafine and fine particles in bronze foundries and in welding. In: Möhlmann C (Ed.) *Ultrafine aerosols at workplaces*, BIA report 7/2003e, pp. 169-178.
- See SW, Balasubramanian R (2006). Physical characteristics of ultrafine particles emitted from different gas cooking methods. *Aerosol Air Qual Res* **6**, 82-92.
- SMT4-CT96-2074 (2000). Development of a method for dustiness testing – Final report of EU contract SMT4-CT96-2074. HSE Report, 2000, IR/L/M/00/11, Health and Safety Laboratory, Sheffield, UK.
- Spiegel-Ciobanu VE (2003). Ultrafine particles created by welding and allied processes. In: Möhlmann C (Ed.) *Ultrafine aerosols at workplaces*, BIA report 7/2003e, 157-168.
- Stefaniak AB, Hoover MD, Dickerson RM, Peterson EJ, Day GA, Breyse PN, Kent MS, Scripsick RC (2003). Surface area of respirable beryllium metal, oxide, and copper alloy aerosols and implications for assessment of exposure risk of chronic beryllium disease. *Am Ind Hyg Assoc J* **64**, 297-305.
- SWISS RE (2004). Nanotechnology. Small matter, many unknown. Swiss Re Publications, Swiss Reinsurance Company, Zurich, Switzerland, 56 pages.
- Thomassen Y, Koch W, Dunkhorst W, Ellingsen DG, Skaugest NP, Jordbecken L, Drablos PA, Weinbruch S (2006). Ultrafine particles at workplaces of a primary aluminum smelter. *J Environ Monit* **8**, 127-133.

- Ullmann MG, Schmidt-Ott A, Friedlander SK (2003). Characterization of nano chain aggregates generated by laser ablation and spark discharge. *J Aerosol Sci*, abstracts of the European Aerosol Conference, pp. S559-S560.
- Vincent JH (1995). Aerosol science for industrial hygienists. Elsevier Science Ltd, Oxford, 409 pages.
- Vincent JH, Clement CF (2000). Ultrafine particles in workplace atmospheres. *Philos Trans Royal Soc London. A*, **358**, 2673-2682.
- Vincent JH (2005). Health-related aerosol measurement: a review of existing sampling criteria and proposals for new ones. *J Environ Monit*. **7(11)** 1037-1053.
- Wake D, Mark D, Northgate C (2002). Ultrafine aerosols in the workplace. *Ann Occup Hyg* **46**, 235-238.
- Wallace L (2005). Ultrafine particles from a vented gas clothes dryer. *Atmos Environ* **39**, 5777-5786.
- Wallace L (2006). Ultrafine and accumulation mode particles: Size-distributions, size-resolved concentrations, and source strengths. *Aerosol Sci Technol* **40**, 348-360.
- Wayne RO, Siegmann HC (2006). Using multiple continuous fine particle monitors to characterize tobacco, incense, candle, cooking, wood burning, and vehicular sources in indoor, outdoor, and in-transit settings. *Atmos Environ* **40**, 821-843.
- Wheatley AD, Sadhra S (2004). Occupational exposure to diesel exhaust fumes. *Ann Occup Hyg* **48**, 369-376.
- Witschger O (1999). Mise en suspension de contamination particulaire radioactive – Synthèse bibliographique. Rapport IPSN/DPEA/SERAC, 99-13, 170 pages.
- Witschger O, Wrobel R, Möhlmann C (2005). Measuring ultrafine aerosols in a meat smokery workplace: exploring sampling techniques. 2nd International Symposium on nanotechnology and Occupational Health, publié dans actes, p. 123.
- Zai S, Zhen H, Jia-song W (2006). Studies on the size distribution, number and mass emission factors of candle particles characterized by modes of burning. *J Aerosol Sci* **37** 1484-1496.
- Zhu Y, Hinds WC, Kim S, Sioutas C (2002). Concentration and size distribution of ultrafine particles near a major highway. *J Air Waste Manag Assoc* **52**, 1032-1042.
- Zimmer AT (2002). The influence of metallurgy on the formation of welding aerosols. *J Environ. Monit* **4**, 628-632.
- Zimmer AT, Biswas P (2000). Mechanistic understanding of aerosol emissions from a brazing operation. *Am Ind Hyg Assoc J* **61**, 351-361.
- Zimmer AT, Biswas P (2001). Characterization of the aerosols resulting from arc welding process. *Aerosol Sci* **32**, 993-1008.
- Zimmer AT, Maynard AD (2002). Investigation of the aerosols produced by a high-speed, hand-held grinder using various substrates. *Ann Occup Hyg* **46**, 663-672.

Voies de pénétration dans l'organisme

3

Ne sont envisagées dans ce chapitre que les voies de pénétration usuellement reconnues comme pertinentes lors de l'exposition professionnelle ; la voie digestive n'a pas été retenue, bien qu'elle existe pour le « consommateur » (présence de nanoparticules dans l'alimentation).

1. Inhalation et dépôt dans les voies respiratoires

O. Witschger

Les particules dispersées dans l'air des lieux de travail (formant ainsi un aérosol) ou dans l'environnement peuvent constituer un risque pour la santé de l'homme si elles sont inhalées. L'évaluation de l'exposition aux aérosols doit refléter la nature et l'ampleur de ce risque. Pour ce faire, il est nécessaire de tenir compte de la façon dont les particules pénètrent *via* le nez et/ou la bouche, et de leur lieu de dépôt dans les voies respiratoires. Ce chapitre présente les connaissances sur le dépôt des particules dans les voies respiratoires, en particulier en ce qui concerne les particules ultra-fines.

Parmi les nombreuses sources disponibles, la base de cette présentation est la publication 66 de la Commission internationale de protection radiobiologique (CIPR), qui décrit le calcul de la dose interne résultant de l'inhalation de radionucléides sous forme d'aérosols. Ce modèle, publié en 1994, est complet, très bien documenté, et

internationalement reconnu dans le domaine de l'évaluation de doses, constituant ainsi un modèle de référence (Lippmann, 2001 ; Phalen, 1999).

De nombreuses études théoriques et expérimentales ont été conduites sur le sujet, essentiellement pour connaître au mieux la dose reçue après inhalation de particules dispersées dans l'air, mais aussi pour développer ou optimiser les méthodes de traitement par « aérosol-thérapie ». Ce n'est que plus récemment que les particules ultra-fines ont fait l'objet d'études spécifiques, en particulier du fait de l'intérêt croissant porté aux effets sur la santé de la pollution particulaire atmosphérique (Martonen et coll., 2005).

1.1. Voies respiratoires

Les voies respiratoires apportent à l'organisme l'oxygène dont il a besoin, durant la phase d'inhalation, et expulsent le dioxyde de carbone, durant la phase d'expiration. Elles constituent également une porte d'entrée des polluants de l'air, notamment des particules qui s'y trouvent en suspension.

Le dépôt dans les voies respiratoires de ces particules inhalées est un processus complexe qui implique, à plusieurs niveaux successifs, de nombreux paramètres anatomiques et physiologiques, et fait appel à différents éléments de mécanique des fluides, de physique et de dynamique des particules. Pour cette raison, on considère généralement un découpage des voies respiratoires en trois zones anatomiques principales. La figure 3.1 indique pour l'homme les zones et les régions principales adoptées par la CIPR (1994).

La première région est celle dite des *voies aériennes supérieures*, qui inclut les fosses nasales, la bouche, le pharynx et le larynx ; cette région est également dénommée région *extra-thoracique* (ET). Le modèle de la CIPR faisant une différence entre respiration par le nez ou par la bouche, cette région est découpée en deux sous-régions, antérieure (ET1) et postérieure (ET2). Ainsi, en situation de respiration par la bouche à 100 %, le dépôt des particules ne concerne que la sous-région ET2.

La deuxième région, dénommée *thoracique* ou *trachéobronchique* (TB), inclut les voies respiratoires de la trachée aux bronchioles terminales, et de laquelle les particules sont éliminées physiquement par l'action du tapis muco-ciliaire (Martinet, 1995).

Enfin, la troisième région se situe au-delà des bronchioles terminales, incluant donc les alvéoles, lieu des échanges gazeux ; elle est dite région *alvéolaire* (ALV).

Ce découpage en trois régions principales (extrathoracique, thoracique et alvéolaire) est également rattaché à la définition des fractions d'aérosols à prendre en compte pour une évaluation chiffrée du risque en situation d'exposition professionnelle (NF EN 481 ; CND ; Vincent, 1995).

Le tableau 3.I indique les surfaces approximatives développées pour un homme adulte correspondant à ce découpage anatomique. Elles représentent des surfaces d'échanges entre le milieu extérieur (l'air) et l'organisme, sur lesquelles les particules inhalées

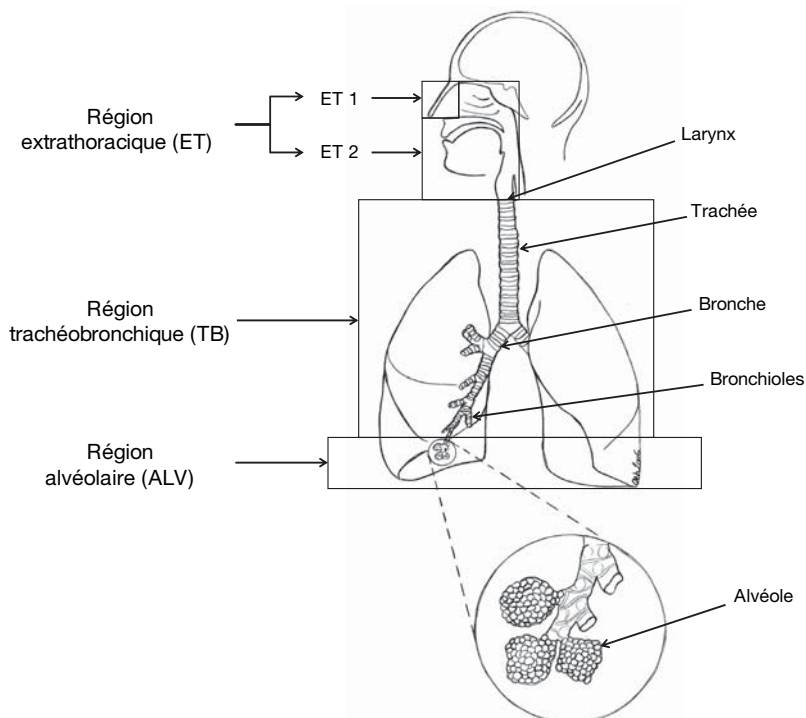


Figure 3.1. Les différentes régions anatomiques des voies respiratoires. Adapté de la publication 66 de la Commission internationale de protection radiobiologique (CIPR, 1994).

Région principale	Zone anatomique (voir figure 3.1)	Surface développée approximative (m ²)
Extrathoracique	ET 1	$2 \cdot 10^{-3}$
	ET 2	$4,5 \cdot 10^{-2}$
Trachéobronchique	BB (bronches)	$2,9 \cdot 10^{-2}$
	bb (bronchioles)	$2,4 \cdot 10^{-1}$
Alvéolaire	Al	140

Tableau 3.1. Surfaces développées dans les différentes régions des voies respiratoires (d'après le tableau 1, page 10 de la publication 66 de la CIPR, 1994).

peuvent éventuellement se déposer. Par minute, c'est approximativement une surface équivalente à 5 à 20 courts de tennis (en fonction de la fréquence respiratoire) qui est accessible aux particules. Ce tableau montre également que ces surfaces varient considérablement des fosses nasales à la région alvéolaire ; le rapport des surfaces entre ces deux régions est d'environ 3 000. Cela signifie que, par exemple dans le cas d'un dépôt homogène entre ces différentes régions, le nombre de particules déposées par unité de

surface (densité surfacique en nombre) serait plus important dans la région extrathoracique que dans la région alvéolaire.

La morphologie des voies respiratoires et les paramètres physiologiques peuvent varier de façon significative entre individus et selon leur activité. Plusieurs facteurs peuvent modifier les caractéristiques des voies respiratoires et par conséquent le dépôt des particules, comme l'âge, le sexe et des syndromes de type obstructif ou restrictif. L'asymétrie des poumons peut également jouer un rôle puisqu'une différence géométrique provoque un changement de trajectoire des particules inhalées, ce qui peut occasionner des différences significatives de fractions déposées entre les poumons droit et gauche.

La prédiction du dépôt par le calcul s'effectue généralement sur des paramètres moyens dits « par défaut » et ne représente donc pas fidèlement les doses (en termes de dépôt) d'aérosol dans une population variée. Cependant, divers modèles permettent de spécifier différents paramètres liés à l'aérosol ou à la physiologie du sujet, et constituent donc de bons outils de calcul prévisionnel. C'est le cas du modèle de la CIPR (1994), celui du National Council on Radiation Protection and Measurements (NCRP, 1997) ou encore du Multiple Path Particle Dosimetry Model (MPPD v1.0), développé conjointement par le Center for Health Research (CIIT) et l'institut national néerlandais pour la santé publique et l'environnement (RIVM, 2002). Si les deux premiers modèles ne considèrent qu'une anatomie symétrique des voies respiratoires, le modèle MPPD intègre des anatomies symétrique et asymétrique. Ce modèle a également un intérêt particulier puisqu'il permet de calculer des fractions déposées chez l'homme mais aussi chez le rat, ce qui peut être très utile en toxicologie, notamment lorsqu'il s'agit d'extrapoler des données (Brown et coll., 2005).

Les tableaux 3.II à 3.IV donnent les différentes valeurs des paramètres en termes de mode de respiration, débit ventilatoire et durée de travail pris en compte dans les calculs de dépôt présentés dans ce chapitre. Ces valeurs sont celles recommandées par la CIPR (1994).

Activité	Mode de respiration	
	Nasal	Oral
Repos (assis)	1	0,7
Légère	1	0,4
Lourde	0,5	0,3

Tableau 3.II. Fraction du débit ventilatoire total passant par le nez pour les deux modes de respiration et en fonction de l'activité pour un adulte de référence d'après le modèle de la CIPR (1994).

Activité	Débit ventilatoire
Repos (assis)	9 l/min (0,54 m ³ /h)
Légère	25 l/min (1,50 m ³ /h)
Lourde	50 l/min (3,00 m ³ /h)

Tableau 3.III. Débit ventilatoire total en fonction de l'activité d'un adulte de référence d'après le modèle de la CIPR (1994).

Travail	Activité		
	Repos (assis)	Légère	Lourde
Standard	2,5 h	5,5 h	-
Lourd	-	7 h	1 h

Tableau 3.IV. Durées journalières de référence par activité en fonction du type de travail d'après le modèle de la CIPR (1994).

1.2. Inhalation des particules

Seules les particules *inhalées* peuvent éventuellement *se déposer* dans les voies respiratoires. Dans un premier temps, il convient d'examiner dans quelle mesure les particules présentes dans le volume d'air inspiré sont effectivement inhalées.

L'efficacité (ou la probabilité) avec laquelle les particules entrent dans le nez ou la bouche du fait de la respiration est dite *inhalabilité* ou *efficacité d'inhalation*. Elle peut être caractérisée par la fraction de particules entrant effectivement par le nez ou la bouche, selon un processus purement physique. Cette question a été étudiée depuis de nombreuses années, pour l'essentiel de manière expérimentale, et des modèles de type semi-empirique développés. Il est donc possible, et relativement simple, d'effectuer des calculs d'inhalabilité. Dans ces modèles, la fraction des particules inhalées dépend uniquement du diamètre aérodynamique des particules et de la vitesse du vent incident. Dans les études expérimentales qui ont servi de base aux développements des modèles, les paramètres comme le débit respiratoire ou bien le mode de respiration (par le nez ou la bouche) n'ont montré qu'une influence relativement faible (Vincent, 1995). Par ailleurs, pour obtenir un modèle applicable à tout type de situation d'exposition professionnelle ou environnementale, il a été décidé que l'inhalabilité devait être moyennée suivant la direction du vent incident.

À titre d'illustration, la figure 3.2 montre la fraction des particules inhalées en fonction de leur diamètre pour trois vitesses d'air : 0, 0,5 et 4 m/s. En air calme (0 m/s), le calcul a été réalisé à partir du modèle de Aitken et coll. (1999). Pour les deux autres conditions de

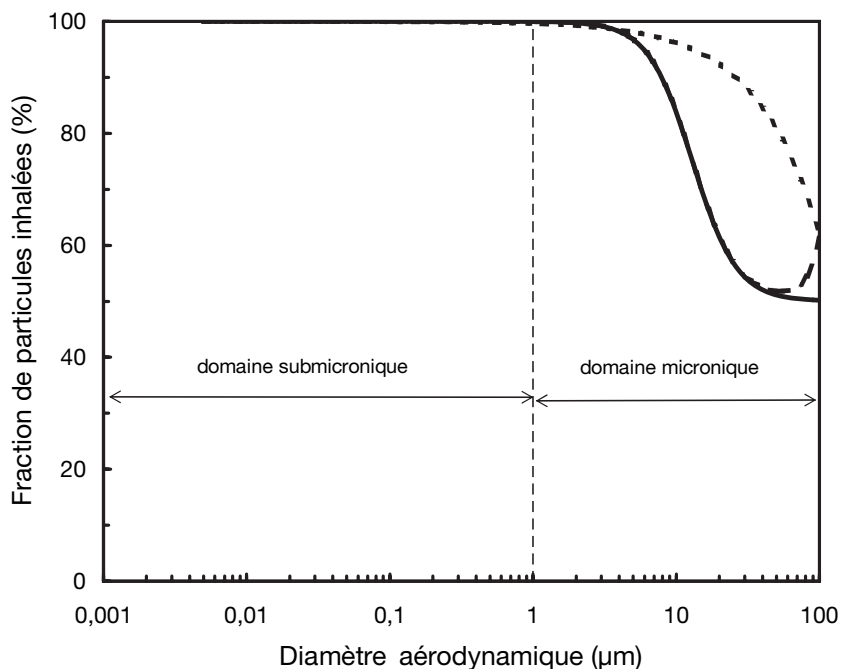


Figure 3.2. Effet de la vitesse du vent incident sur la fraction de particules inhalées (en %) en fonction du diamètre des particules. Calcul effectué suivant le modèle d'inhalabilité de la CIPR (1994) pour deux vitesses de vent : 0,5 m/s (courbe en trait plein) et 4 m/s (courbe en traits pointillés longs). La courbe en pointillés courts décrit l'inhalabilité en air calme calculée d'après le modèle de Aitken et coll. (1999). Les particules sont considérées comme sphériques et de masse volumique 1 g/cm³.

vitesse d'air, le calcul a été effectué d'après le modèle de la CIPR (1994). On peut observer que la fraction inhalée est au maximum égale à 100 % et qu'elle décroît au fur et à mesure que le diamètre des particules augmente. En particulier, on peut voir que les particules de taille submicronique ($< 1 \mu\text{m}$) sont inhalées avec une probabilité de 100 % quel que soit leur diamètre. En conséquence, toutes les particules ultra-fines présentes dans le volume d'air inspiré sont inhalées, c'est-à-dire qu'elles pénètrent dans les voies respiratoires.

Au-delà de 50 μm environ, c'est l'inertie des particules qui conduit à un décalage entre les deux conditions de vitesses d'air (0,5 et 4 m/s).

1.3. Dépôt des particules inhalées

1.3.1. Différents mécanismes physiques mis en jeu

La probabilité de dépôt est la probabilité moyenne qu'une particule inhalée d'un diamètre donné se dépose à un endroit quelconque le long des voies respiratoires : voies

aériennes supérieures, trachée, bronches, bronchioles respiratoires non ciliées, sacs alvéolaires. Le dépôt *total* est la somme des probabilités de dépôt dans les trois régions anatomiques (ou compartiments respiratoires) que sont la région extrathoracique, l'arbre trachéobronchique, et la région alvéolaire.

Les particules inhalées peuvent être exhalées ou bien se déposer dans les différentes régions par l'action combinée de cinq mécanismes, qui sont (figure 3.3 ; voir chapitre 1, point 3) :

- *la sédimentation*, action de la gravité sur les particules. Son effet augmente avec la taille, la densité de la particule et son temps de résidence dans les voies respiratoires. Le temps de résidence s'accroît par exemple lorsque la respiration ralentit ;
- *l'impaction*, liée à l'inertie des particules qui ne peuvent suivre fidèlement l'écoulement de l'air, du fait des brusques changements de direction imposés par la géométrie des voies respiratoires et des vitesses d'air. Son effet s'accroît avec la taille et la densité de la particule, et la vitesse de l'air. La vitesse de l'air augmente lorsque la respiration se fait plus forte ;
- *l'interception*. Lorsque l'extrémité d'une particule entre en contact avec la paroi d'un conduit, elle se dépose. Ce mécanisme peut être significatif pour les particules de formes allongées comme les fibres ou les agglomérats de particules. Il l'est beaucoup moins pour les particules sphériques ou les agglomérats compacts. La probabilité qu'une particule se dépose suivant ce mécanisme augmente lorsque la longueur caractéristique de la particule augmente relativement au diamètre des conduits des voies respiratoires ;
- *la diffusion*, ou mouvement brownien, mouvement quasi aléatoire des particules causé par les chocs des molécules de l'air sur la particule. C'est un mécanisme important lorsque la vitesse de l'air est proche de zéro et que les particules sont caractérisées par un coefficient de diffusion élevé lié à leur très petite taille : le dépôt par diffusion est le mécanisme prédominant pour les particules inférieures à environ 200 – 300 nm (voir chapitre 1, point 2.2.2) ;
- *les effets électrostatiques*. Deux mécanismes peuvent être essentiellement à l'origine du dépôt des particules électriquement chargées. Le premier est l'effet de l'attraction vers la surface par la charge image induite par la particule (voir chapitre 1, point 3, l'effet électrostatique). Le deuxième résulte de la répulsion mutuelle des particules lorsqu'elles sont chargées de façon unipolaire et présentes en très grand nombre.

Les quatre premiers mécanismes de dépôt concernent toutes les particules, électriquement neutres ou chargées. Dans la grande majorité des situations, le mécanisme de dépôt électrostatique est négligé alors qu'il peut être significatif, notamment pour les PUF. Cohen et coll. (1995a, 1995b) ont par exemple montré que l'accroissement du dépôt du fait de la charge des particules, même faible, n'était pas négligeable (tableau 3.V). Ils concluent que les effets électrostatiques devraient être pris en compte dans les modèles dosimétriques destinés à évaluer les effets sur la santé.

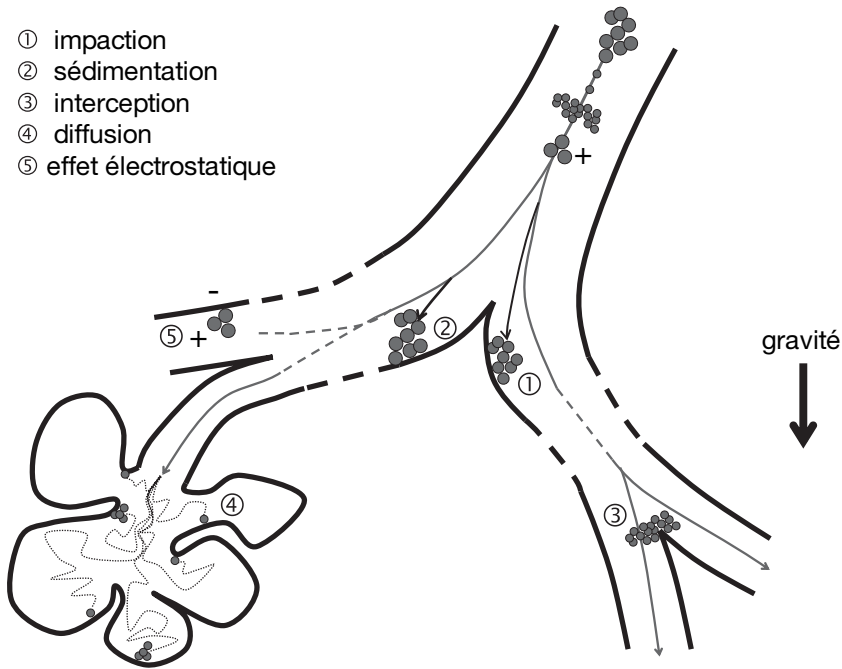


Figure 3.3. Illustration des différents mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires. Pour ce qui est de l'effet électrostatique, seul celui dû à la charge image induite est illustré. Adapté de McClellan (2001).

Charge des particules	Diamètre des particules	
	20 nm	125 nm
Une charge	5,3	6,2
Équilibre de Boltzmann (charge moyenne nulle)	1,6	2,7
Zéro charge	1	1

Tableau 3.V. Efficacité moyenne de dépôt relative à celle de particules non chargées. Particules de fluorescéine. Expériences réalisées avec une réplique moulée de voies respiratoires humaines. D'après Cohen et coll., 1995a.

Compte tenu de la nature des parois sur lesquelles les particules se déposent et des conditions aérauliques à l'intérieur des voies respiratoires, les particules déposées ne sont pas remises en suspension pour être éventuellement exhalées ou redéposées sur un autre site.

L'hygroscopicité des particules peut également affecter leur dépôt. Une fois dans les voies respiratoires, les particules sont exposées aux conditions de température et

d'humidité qui y règnent, à savoir un air très humide ($\approx 37^\circ\text{C}$ et $\approx 99,5\%$ HR). Si elles sont sèches et hygroscopiques, elles peuvent grossir par suite de la diffusion de molécules d'eau sur leur surface ; ce grossissement est très rapide : une particule hygroscopique de 200 nm atteint sa dimension d'équilibre en 1 seconde environ. L'augmentation du diamètre joue en faveur d'une diminution des effets de la diffusion et d'une augmentation des effets aérodynamiques (principalement sédimentation et inertie). C'est-à-dire que le dépôt des particules hygroscopiques de diamètre supérieur à environ 100 nm sera plus important que celui des particules non hygroscopiques de même diamètre. Pour les particules de diamètre inférieur à environ 100 nm, ce sera l'inverse. D'une façon générale, l'accroissement de l'hygroscopicité va engendrer un décalage de la courbe de dépôt vers les diamètres plus petits (Broday et Georgopoulos, 2001 ; Asgharian, 2004). La prise en compte de cet effet se complique lorsque, par exemple, l'aérosol inhalé est composé d'un mélange de particules non hygroscopiques et hygroscopiques. Jusqu'à présent, ce facteur n'est pas pris en compte dans les modèles destinés à l'évaluation des effets sur la santé.

1.3.2. Différents diamètres caractéristiques des particules

Un point important concerne le diamètre équivalent à prendre en compte pour décrire les différents mécanismes de dépôt (voir chapitre 2, point 1.1.1). Si le *diamètre équivalent aérodynamique* (da) est approprié pour caractériser le dépôt par sédimentation, par impaction et par interception, il ne l'est plus pour caractériser le dépôt par diffusion. Dans ce cas, c'est le *diamètre équivalent de diffusion* (encore dénommé *diamètre thermodynamique*) de la particule qui est pertinent. Il est défini comme le diamètre de la particule sphérique possédant le même coefficient de diffusion brownienne que la particule considérée. Pour les particules compactes, ce diamètre est très proche du diamètre physique de la particule, ou encore du *diamètre équivalent en volume* (dv) (Baron et Willeke, 2001). La relation entre les deux diamètres da et dv est la suivante :

$$da = dv \cdot \sqrt{\frac{\chi \rho_p}{\rho_0} \cdot \frac{Cu(da)}{Cu(dv)}}$$

où χ désigne le facteur de forme dynamique de la particule, et Cu le facteur de correction de Cunningham ; ρ_p et ρ_0 sont respectivement la masse volumique de la particule considérée et la masse volumique de référence (1 g/cm^3 ; voir équation 3, chapitre 2, point 1.1.1).

La relation liant les deux diamètres équivalents étant implicite, sa résolution nécessite un calcul itératif. Dans le cas de particules sphériques ($\chi = 1$) et de masse volumique unité, la relation conduit à l'égalité entre les deux diamètres équivalents.

1.3.3. Modélisation du dépôt

La modélisation du dépôt a été réalisée suivant différentes approches qui peuvent être classées en trois catégories principales : semi-empirique, déterministe ou stochastique. Les modèles semi-empiriques sont basés sur l'ajustement de relations théoriques à des données expérimentales obtenues chez l'homme, ou avec des répliques de parties de voies respiratoires humaines. Les modèles déterministes prennent en compte la nature physique des voies respiratoires, des écoulements d'air et des particules pour, à l'aide des équations de mécanique des fluides et de dynamique des particules, aboutir à un calcul de trajectoire de particule et une fraction déposée. Parmi les travaux publiés mettant en œuvre ce type d'approche, on peut citer ceux de Zhang et coll. (2005) qui ont déterminé les sites de dépôt des PUF au niveau des voies aériennes supérieures (zone buccale) et trachéobronchique. Enfin, l'approche stochastique tient dans la prise en compte de la variabilité morphologique aléatoire des voies respiratoires. Ce type d'approche permet d'intégrer une certaine variabilité inter-individu ou intra-individu (Martonen et coll., 2005).

Parmi les modèles publiés et utilisés par la communauté scientifique, celui de la Commission internationale de protection radiobiologique (CIPR, 1994) ou celui du National Council on Radiation Protection and Measurements (NCRP, 1997) sont des modèles semi-empiriques. Le modèle MPPD (Multiple Path Particle Dosimetry ; RIVM, 2002) est, quant à lui, déterministe et offre également la possibilité d'effectuer des calculs suivant une approche stochastique.

Dans la suite, tous les calculs présentés ont été effectués à l'aide du logiciel LUDEP (2000), qui intègre le modèle de la CIPR.

1.3.4. Dépôt total dans les voies respiratoires

La figure 3.4 illustre le dépôt total en fonction du diamètre des particules entre 1 nm et 100 μm , calculé suivant le modèle de la CIPR. Ces courbes correspondent à un sujet respirant par le nez et effectuant un travail standard. Les particules sont considérées comme sphériques et de masse volumique égale à 1 g/cm^3 .

La courbe en trait plein n'intègre pas l'inhalabilité, ce qui explique pourquoi le dépôt tend vers la valeur 100 % pour les diamètres les plus élevés ; la courbe en pointillés l'intègre. La fraction déposée décrite par la courbe en pointillés représente donc directement la fraction relative à l'aérosol ambiant, c'est-à-dire celui auquel le sujet est exposé. On peut voir qu'en deçà de $\approx 1 \mu\text{m}$, les deux courbes se superposent, ce qui indique que l'inhalabilité ne joue aucun rôle pour les particules de taille plus petite (voir point 1.2 et figure 3.2) ; c'est donc le cas pour les PUF.

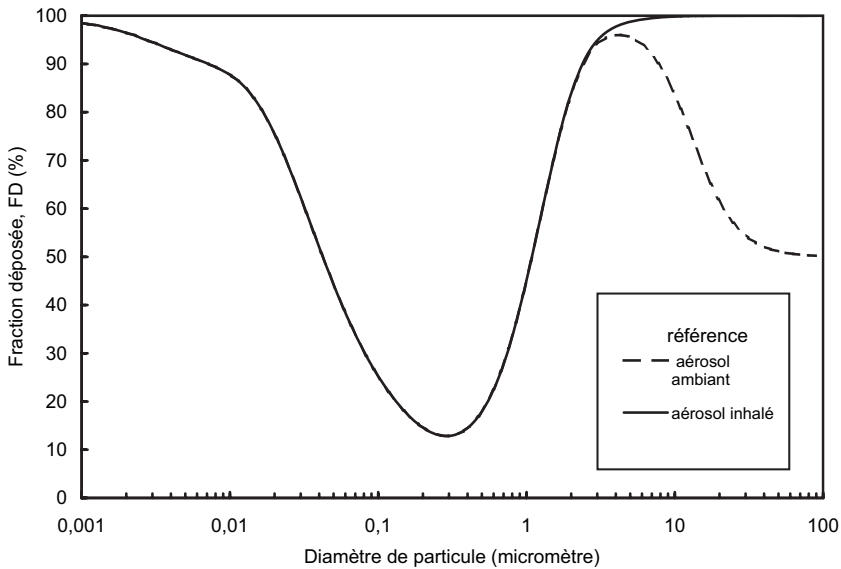


Figure 3.4. Prédiction du dépôt total dans les voies respiratoires chez l'homme en fonction du diamètre des particules. La courbe en trait plein n'inclut pas l'inhalabilité, alors que la courbe en pointillés l'inclut. Les conditions correspondent à un travail standard pour une personne respirant par le nez suivant le modèle de la CIPR (1994). Les particules sont considérées comme sphériques ($\chi = 1$) et de masse volumique $\rho_p = \rho_0 = 1 \text{ g/cm}^3$. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel LUDEP (2000).

La figure 3.4 montre que la courbe de dépôt total atteint un minimum vers 300 nm. À cette taille, les particules transportées avec l'air inhalé ont une mobilité intrinsèque insuffisante pour les faire entrer en contact avec les surfaces des voies respiratoires. Elles sont trop grosses pour que la diffusion soit importante et trop petites pour que l'impaction et la sédimentation soient sensibles. Cette forme de courbe n'est pas exclusive du dépôt dans les voies respiratoires car on la retrouve en filtration des aérosols (voir chapitre 1, point 3) et cela parce que les mêmes mécanismes physiques sont mis en jeu.

Au minimum de dépôt, seules environ 10 à 20 % des particules inhalées ne seront pas exhalées. En grande partie, ces particules non exhalées ont été transférées lors de la respiration, de façon presque irréversible, dans les différents volumes morts des voies respiratoires où, du fait d'un temps de résidence important, elles finiront par se déposer par effet combiné de la diffusion et de la sédimentation.

En deçà du minimum de dépôt, la fraction déposée croît de manière significative lorsque le diamètre de la particule diminue, pour atteindre environ 100 %. Ce phénomène s'explique simplement par le fait qu'au fur et à mesure que le diamètre des particules diminue, la diffusion augmente. À l'extrême limite inférieure, lorsque les particules

approchent la taille moléculaire, elles tendent à se comporter comme un gaz. La différence entre un comportement gazeux et particulaire tient alors dans le phénomène de capture par la surface de contact. Une particule ayant diffusé au contact d'une surface solide y restera collée, alors que, en l'absence d'adsorption, la molécule gazeuse « rebondira ».

La figure 3.5 montre la fraction totale déposée pour trois types de particules caractérisés par des couples (ρ_p, χ) différents en fonction d'une part du diamètre aérodynamique équivalent (da), et d'autre part du diamètre de diffusion équivalent (confondu avec le diamètre équivalent en volume – dv – pour le cas de particules compactes). La courbe noire la plus épaisse correspond strictement aux conditions de la figure 3.4 précédente, à savoir que les particules sont sphériques et de même masse volumique, égale à 1 g/cm³. On peut observer sur la figure 3.5 que, dès lors que $\rho_p \neq 1$ g/cm³ et $\chi \neq 1$, les deux courbes exprimées, d'une part en fonction de da , et d'autre part en fonction de dv , sont distinctes sur toute la gamme des diamètres. Par ailleurs, on peut constater que les courbes en fonction de da (en pointillés sur la figure 3.5) se confondent pour des valeurs de $da \geq 1$ µm, alors que celles en fonctions de dv (en trait plein sur la figure 3.5) se confondent pour des valeurs de $dv \leq 100$ nm.

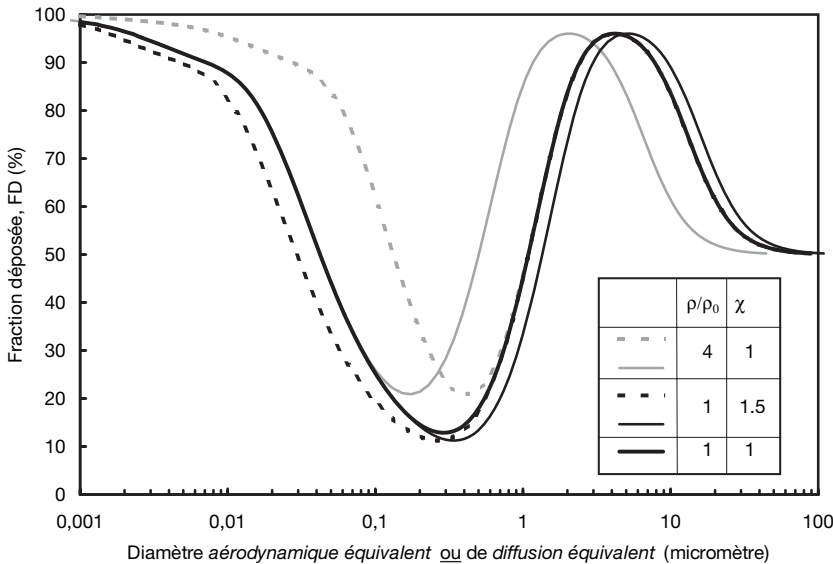


Figure 3.5. Prédiction du dépôt total dans les voies respiratoires chez l'homme en fonction du diamètre des particules. Les courbes en pointillés sont exprimées en fonction du diamètre aérodynamique équivalent, tandis que les courbes pleines sont exprimées en fonction du diamètre de diffusion équivalent. Les calculs ont été effectués pour différentes valeurs de masses volumiques de particules ρ_p et facteur de forme dynamique χ ; $\rho_0 = 1$ g/cm³. Les conditions correspondent à un travail standard pour une personne respirant par le nez, comme pour la figure 3.4. Les calculs ont été effectués à l'aide logiciel LUDEP (2000).

Enfin, pour une même condition (ρ_p, χ), les courbes ne peuvent être obtenues par simple translation suivant l'axe des abscisses, car l'écart entre da et dv n'est pas invariant sur toute la gamme des diamètres (voir chapitre 2, point 1). En conséquence, dès lors que les particules diffèrent des conditions « idéales » ($\rho_p = 1 \text{ g/cm}^3$, $\chi = 1$), il est important de bien spécifier le diamètre dont il est question afin d'éviter des erreurs.

Soulignons que l'hypothèse faite jusqu'ici est celle de particules compactes. Or il existe de nombreuses situations où les particules inhalées ne sont pas compactes, mais forment des agrégats plus ou moins complexes (particules issues de procédés de combustion, particules émises lors de la manipulation de poudres nanostructurées). Le comportement des particules ne peut alors pas être seulement caractérisé par les paramètres communs que sont la masse volumique et le facteur de forme dynamique ; d'autres paramètres, comme ceux issus de l'approche fractale, peuvent alors être utiles (voir chapitre 2, point 1). Un axe d'étude à approfondir est celui de la prise en compte des caractéristiques morphologiques des agrégats dans la modélisation du dépôt dans les voies respiratoires pour les particules ultra-fines.

Les figures 3.4 et 3.5 sont tracées en fonction du diamètre des particules, c'est-à-dire que chaque point d'une des courbes donne la fraction déposée pour un aérosol monodispersé. Pour les aérosols polydispersés, il est nécessaire de prendre en compte la distribution granulométrique dans le calcul du dépôt (figure 3.6). L'aérosol polydispersé considéré est réparti suivant une loi de distribution log-normale et unimodale, pleinement définie en fonction d'un diamètre médian et d'un écart-type géométrique σ_g . La courbe en trait plein correspond strictement aux conditions de la figure 3.4 ci-dessus (aérosol monodispersé, $\sigma_g = 1$). Dans ce cas, le diamètre médian et le diamètre de la particule se confondent. Les courbes en pointillés correspondent respectivement à un aérosol polydispersé d'écarts-types géométriques $\sigma_g = 2$ et 3 : plus l'aérosol est polydispersé, plus la courbe de dépôt total s'aplatit. Signalons que $\sigma_g = 3$ caractérise un aérosol dont la distribution granulométrique couvrirait à peu près trois ordres de grandeurs. L'hypothèse retenue dans les calculs pour la figure 3.6 est celle d'un aérosol monomodal ; il existe de nombreuses situations où cette hypothèse n'est pas valable. On peut citer l'exemple de l'aérosol atmosphérique, généralement considéré comme trimodal (voir chapitre 2, point 2.2). Il est alors nécessaire de prendre en compte ce caractère multi-modal pour calculer la fraction déposée pour la situation considérée. Compte tenu des multiples paramètres (5 nécessaires dans le cas d'une distribution à trois modes), il est impossible de construire une figure générique.

Les figures 3.4 à 3.6 ont été obtenues pour des conditions correspondant à un travail standard et pour une personne respirant par le nez. C'est-à-dire que la personne passe un tiers de son temps assise, et le reste dans une activité « légère » (voir les tableaux 3.II à 3.IV). Ces conditions correspondent aux valeurs recommandées par la CIPR pour un « travailleur standard » en l'absence de données plus précises. La figure 3.7 montre la fraction totale déposée pour un sujet (mode de respiration de type nasal) effectuant

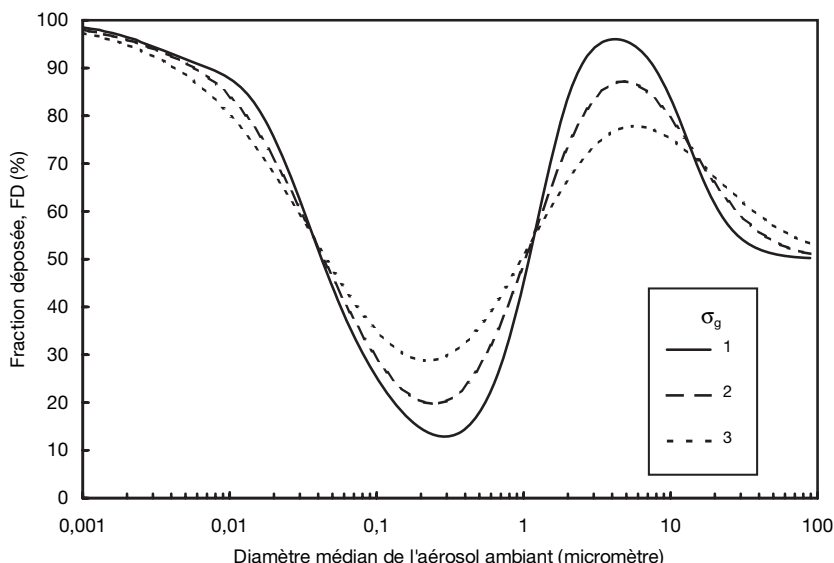


Figure 3.6. Prédiction du dépôt total dans les voies respiratoires chez l'homme pour différents aérosols ambiants. L'aérosol ambiant est considéré comme monodispersé (courbe en trait plein) ou polydispersé (courbes en pointillés). Les aérosols polydispersés sont considérés comme suivant une distribution granulométrique log-normale caractérisée par un diamètre médian et un écart-type géométrique σ_g . Les particules sont considérées comme sphériques ($\chi = 1$) et de masse volumique $\rho_p = \rho_0 = 1 \text{ g/cm}^3$. Les conditions correspondent à un travail standard pour une personne respirant par le nez comme pour la figure 3.4. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel LUDEP (2000).

différentes activités : *repos (assis)*, *légère* et *lourde*. Soulignons que pour l'activité *lourde*, la fraction passant effectivement par le nez n'est que de 50 % (voir tableau 3.II), le reste passant par la bouche. Par ailleurs, chaque activité est caractérisée par différentes valeurs des paramètres de respiration que sont le débit et la fréquence respiratoire, et le volume courant.

On peut observer sur la figure 3.7 que les courbes diffèrent sensiblement suivant l'activité. Pour les particules de diamètres inférieurs à $\approx 20 \text{ nm}$, la fraction déposée est plus importante pour les activités légère et lourde que pour l'activité de repos. Entre $\approx 20 \text{ nm}$ et le minimum de dépôt (environ 300 nm), la fraction déposée est d'autant plus importante que le niveau d'activité est faible, ce qui s'explique essentiellement par le temps de résidence des particules, qui diffère en fonction du niveau d'activité. Pour les particules de diamètres supérieurs à $\approx 300 \text{ nm}$, c'est l'activité légère qui conduit à la fraction déposée la plus importante, les activités de repos et lourde conduisant à une fraction déposée équivalente. Pour expliquer ce résultat qui peut

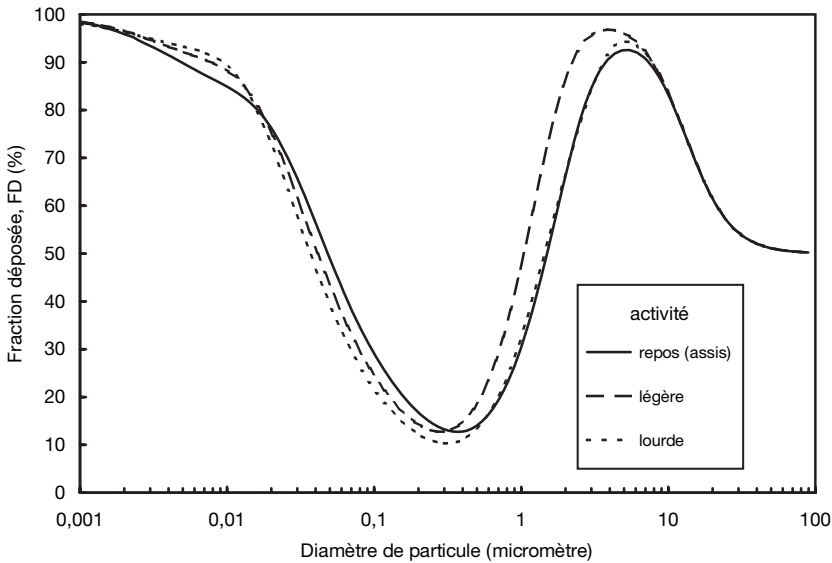


Figure 3.7. Prédiction du dépôt total dans les voies respiratoires chez l'homme effectuant différentes activités. Les particules sont considérées comme sphériques ($\chi = 1$) et de masse volumique $\rho_p = \rho_0 = 1 \text{ g/cm}^3$. Les conditions correspondent à une personne dont le mode de respiration est nasal. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel LUDEP (2000).

paraître inattendu, il faut à la fois prendre en compte le fait que pour l'activité lourde une fraction de l'aérosol passe par la bouche, et que le dépôt s'effectue essentiellement par inertie et sédimentation. Finalement, il apparaît que si l'activité joue un rôle important dans le dépôt des particules microniques, ce facteur semble moins influent pour les particules ultra-fines.

1.3.5. Dépôt régional dans les voies respiratoires

Le dépôt des particules inhalées n'est généralement pas uniforme dans l'ensemble des voies respiratoires. Cela peut être à l'origine de doses localement importantes (engendrant des effets toxiques) alors que la même dose globale pourrait être jugée sans effet spécifique. L'évaluation de la dose par région anatomique est donc d'un grand intérêt dès lors que l'on s'intéresse aux effets sur la santé ou bien à l'évaluation des expositions. De manière conventionnelle, le dépôt régional est examiné pour les trois régions anatomiques extrathoracique (ET), trachéobronchique (TB) et alvéolaire (ALV), la fraction totale déposée étant la somme des fractions régionales déposées.

La figure 3.8 montre le dépôt total et régional en fonction du diamètre des particules – entre 1 nm et 100 μm – pour les conditions de la figure 3.4. La courbe en pointillés de la figure 3.8 correspond donc strictement à la courbe en pointillés de la figure 3.4. Les particules supérieures à ≈ 10 nm se déposent majoritairement dans la région alvéolaire, tandis que celles qui sont plus petites se déposent principalement dans la région extrathoracique et, dans une moindre mesure, dans la région trachéobronchique. Ceci s'explique par leur très forte diffusivité. La figure 3.8 souligne également que la distribution du dépôt des PUF est plus uniforme dans l'ensemble des voies respiratoires que pour les particules microniques. Toutefois, en termes de particules déposées par unité de surface (densité surfacique en nombre), le dépôt est plus important au niveau des fosses nasales puisque, comme déjà vu, la surface développée à ce niveau est environ 3 000 fois plus petite que celle de la région alvéolaire. En mode de respiration nasale, une fraction non négligeable du dépôt extrathoracique peut donc se déposer sur une zone particulière des cavités nasales, située à leur partie supérieure et

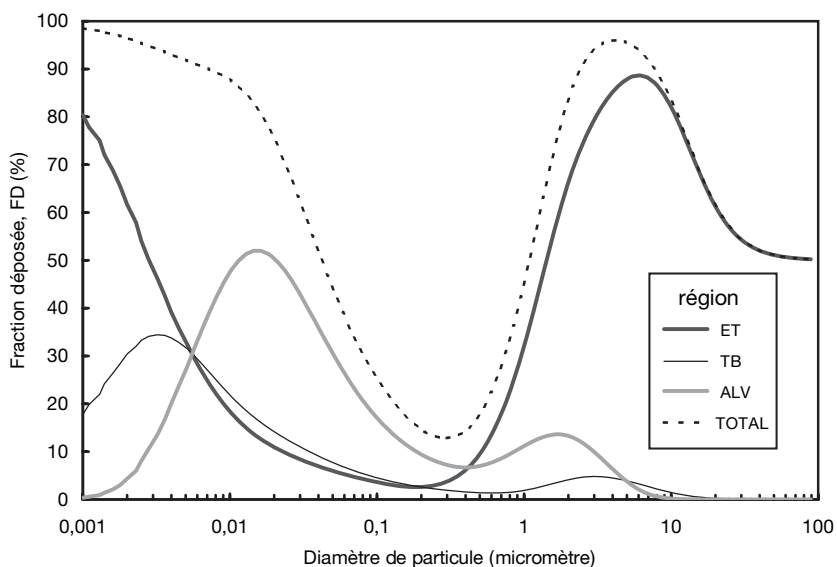


Figure 3.8. Prédiction des dépôts total et régional chez l'homme en fonction du diamètre des particules. La courbe en pointillés présente la fraction totale déposée (TOTAL). Les courbes en trait plein correspondent respectivement aux fractions déposées dans les régions extrathoracique (ET), trachéobronchique (TB) et alvéolaire (ALV). Les conditions correspondent à un travail standard pour une personne respirant par le nez, comme pour la figure 3.4. Les particules sont considérées comme sphériques ($\chi = 1$) et de masse volumique $\rho_p = \rho_0 = 1 \text{ g/cm}^3$. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel LUDEP (2000).

tapissées de cellules nerveuses de l'odorat : l'épithélium olfactif, en communication directe avec le système nerveux central. Plusieurs études montrent que cette zone particulière peut constituer une porte d'entrée directe vers le cerveau (Oberdörster et coll., 2004), aspect développé dans le point 4 de ce chapitre.

Le dépôt plus diffus dans l'ensemble des voies respiratoires contribue à créer plus de sites d'interaction et donc une plus grande capacité pour les PUF à être absorbées et à transporter des substances éventuellement toxiques (Zhang et coll., 2005).

La figure 3.9 montre l'effet du mode de respiration (oral ou nasal) sur le dépôt régional des particules. Noter que, sur la gamme granulométrique comprise entre environ 10 nm et 200 nm, le mode de respiration a peu d'effet sur les fractions régionales déposées. En deçà de 10 nm, une respiration nasale conduit à une fraction déposée dans la région extrathoracique plus importante que pour une respiration orale ; ceci s'explique par la diffusivité élevée de ces particules.

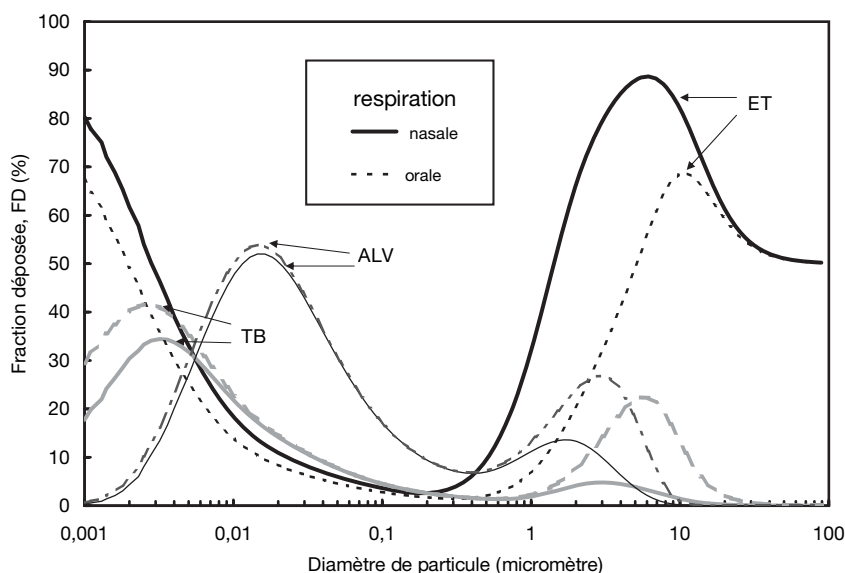


Figure 3.9. Prédiction du dépôt régional chez l'homme en fonction du diamètre des particules. Les courbes pleines correspondent à une respiration nasale, les pointillées à une respiration orale. Les courbes correspondent respectivement aux fractions déposées dans les régions extrathoracique (ET), trachéobronchique (TB) et alvéolaire (ALV). Les conditions correspondent à un travail standard suivant la CIPR. Les particules sont considérées comme sphériques ($\chi = 1$) et de masse volumique $\rho_p = \rho_0 = 1 \text{ g/cm}^3$. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel LUDEP (2000).

1.3.6. Comparaison du modèle de la CIPR avec des données récentes chez l'homme

Le modèle de dépôt de la CIPR a été développé il y a plus de dix ans, alors que les données expérimentales concernant le dépôt des PUF chez l'homme étaient limitées. Il est utile, en prenant en compte les données publiées depuis, d'en vérifier les performances.

Le dépôt des particules peut être étudié expérimentalement soit sur des répliques de parties de voies respiratoires (fosses nasales, voies aériennes supérieures, arbre trachéo-bronchique, etc.), soit directement chez l'homme. Pour les études effectuées avec des répliques, une difficulté réside dans le caractère réaliste de la réplique ; certaines méthodes font appel à des techniques comme la plastination de parties de corps humains issues d'autopsies (Steinke et coll., 2006).

Note. La plastination est une technique de conservation d'éléments anatomiques inventée en Allemagne dans les années 70. Après déshydratation, l'eau et les graisses des tissus sont remplacés par une résine polymérisable de type époxy, silicone ou encore polyester, selon les buts recherchés.

Pour ces études, les paramètres expérimentaux peuvent être bien contrôlés, et donc favoriser la validation des modèles quels qu'ils soient (Cohen et coll., 1995a ; Cheng, 2003 ; Hoffmann et coll., 2003). On peut citer, entre autres, les travaux de Smith et coll. (2001) sur le dépôt des particules nanométriques (1,75, 10 et 40 nm) dans des répliques de voies trachéobronchiques de sujets humains de différents âges (3, 16 et 23 ans). Selon ces auteurs, la dépendance du dépôt vis-à-vis de l'âge n'était évidente que pour le diamètre le plus petit testé (1,75 nm). Une autre étude (Kelly et coll., 2004a) a examiné si deux méthodes différentes de fabrication de répliques (basées sur un même modèle humain de fosses nasales) conduisait à des résultats différents. Les auteurs ont mesuré le dépôt de particules nanométriques (diamètres compris entre 5 nm et 150 nm) pour différents débits inspiratoires. L'analyse des résultats indique que les petites différences observées ne pouvaient être attribuées à la méthode de fabrication des répliques. Ce résultat, valable pour les diamètres inférieurs à 150 nm, ne semble pas applicable à des particules plus grosses, dont le dépôt est régi par l'inertie (Kelly et coll., 2004b).

In fine, seules les études expérimentales conduites chez des volontaires humains peuvent constituer de véritables bases de validation des modèles. Ces études offrent également les avantages d'intégrer la notion de variabilité intra-sujet et inter-sujet, d'étudier les dépôts chez des sujets sains (Jaques et Kim, 2000 ; Kim et Jaques, 2004), âgés (Kim et Jaques, 2005), ou atteints de divers syndromes ou maladies respiratoires (Brown et coll., 2002), d'examiner l'effet d'une activité sur le dépôt (Daigle et coll., 2003), ou encore de tester différents types d'aérosols (Morowska et coll., 2005).

Dans la quasi-totalité des cas, les études *in vivo* conduisent à déterminer la fraction totale déposée par le biais de mesures (granulométrie, concentration) sur les aérosols inhalés

et expirés. Sur le même principe, Kim et Jaques (2000) ont mis au point une méthode permettant de mesurer la fraction déposée dans les différentes régions ; cette méthode est fondée sur la délivrance séquentielle de petites bouffées d'aérosol test. Une bouffée de faible volume est injectée dans le flux d'air inspiré à un certain temps tandis que le sujet inhale le volume prédéterminé par l'essai et exhale. En changeant le temps d'injection, la bouffée est délivrée séquentiellement à différentes profondeurs des voies respiratoires. À partir des mesures de concentrations des bouffées inhalées et exhalées, il est possible de déterminer la fraction de l'aérosol inhalé qui s'est déposée dans différents compartiments respiratoires.

La figure 3.10 compare les fractions totale et régionales déposées obtenues suivant cette méthode (Kim et Jaques, 2000) à celles calculées à l'aide du modèle de la CIPR. Les valeurs des paramètres d'entrée utilisées pour le calcul correspondent aux valeurs

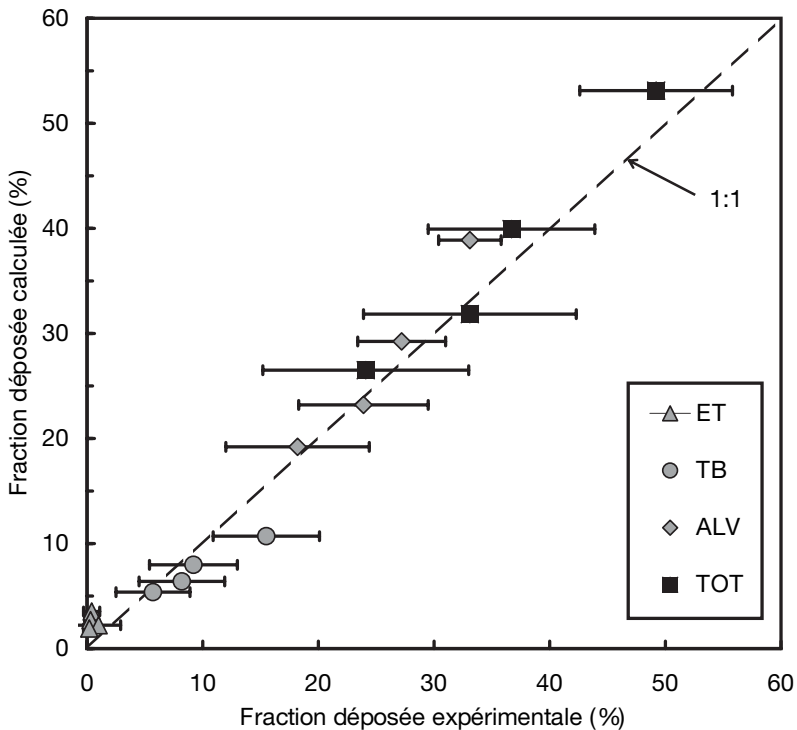


Figure 3.10. Comparaison entre les fractions déposées totales (TOT) et régionales (extrathoracique (ET), trachéobronchique (TB), alvéolaire (ALV)) calculées à l'aide du modèle de la CIPR (1994) et celles obtenues expérimentalement chez l'homme par Kim et Jaques (2000, tableau 2). Les barres d'erreur correspondent à ± 1 écart-type. Les calculs ont été effectués pour les valeurs moyennes indiquées dans l'article. Chaque série de points correspond à des valeurs obtenues pour quatre aérosols polydispersés de diamètre médian en nombre 40, 60, 80 et 100 nm et d'écart-type géométrique $\approx 1,3$.

moyennes indiquées par Kim et Jaques. Les essais ont été réalisés chez des adultes mâles en bonne santé pour quatre aérosols d'essais de 40, 60, 80 et 100 nm. Les données calculées selon le modèle de la CIPR sont, pour cette étude, en bon accord avec les données expérimentales.

Finalement ces comparaisons, même si elles ne sont pas exhaustives, contribuent à valider le modèle de calcul de la CIPR pour les fractions déposées (totales et régionales) de particules ultra-fines ; des données plus détaillées sont présentées au chapitre 4, point 3.

1.3.7. Critères d'échantillonnage pour l'évaluation de l'exposition aux particules ultra-fines

Idéalement, tout échantillonneur d'aérosol destiné à caractériser une exposition professionnelle devrait produire un résultat qui puisse être interprété de manière non équivoque en termes de niveau de risque pour la santé. Jusqu'à présent, l'approche retenue pour l'évaluation des expositions se base sur le concept de probabilité de pénétration des particules dans les voies respiratoires (Vincent, 1995). Dans ce cadre, des critères ont été définis au niveau international pour l'échantillonnage des aérosols en lien avec leurs effets potentiels sur la santé. Il s'agit des trois fractions dites *conventionnelles* (NF EN 481, CND) : inhalable, thoracique et alvéolaire.

Lorsque l'on utilise, pour une évaluation de risque, des données d'échantillonnage provenant d'un instrument destiné à évaluer, par exemple, la fraction alvéolaire de l'aérosol ambiant, on fait l'hypothèse implicite que la concentration de la fraction massique mesurée représente la dose déposée dans la région alvéolaire. Une conséquence en est que des résultats similaires d'échantillonnages de la fraction alvéolaire, obtenus pour différentes conditions d'exposition mais pour le même matériau, seront interprétés comme représentant la même dose potentielle. Autrement dit, on considère qu'à un même niveau d'exposition pour une substance donnée correspond théoriquement un même effet potentiel. Cette approche peut être erronée, puisque seule une fraction des particules pénétrant dans une région des voies respiratoires s'y dépose effectivement, et seules les particules déposées peuvent éventuellement engendrer un effet.

Afin d'illustrer ce propos et d'examiner théoriquement l'ampleur de l'erreur possible, des calculs de dose (dépôt) ont été effectués pour différents aérosols polydispersés qui conduiraient à la même concentration en fraction alvéolaire. Les résultats sont présentés (figure 3.11) par rapport à ceux obtenus pour un aérosol polydispersé de diamètre médian $DM = 5 \mu m$. Les barres noires valent toutes l'unité, ce qui signifie que les quatre cas sont bien similaires en termes de concentration de la fraction alvéolaire : on considère donc que les expositions sont similaires. Les barres grises et blanches

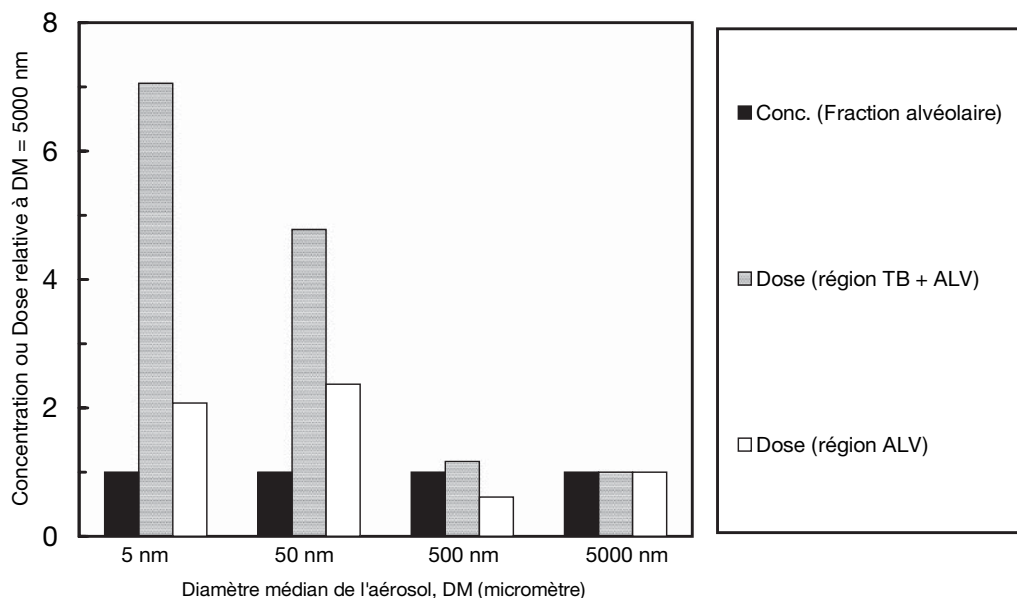


Figure 3.11. Concentration en fraction alvéolaire ou dose déposée dans les régions TB + ALV et ALV en fonction du diamètre médian DM d'un aérosol ambiant polydispersé. La concentration et les doses sont exprimées relativement à celles pour l'aérosol de DM = 5 μm . L'aérosol ambiant est considéré comme log-normal mono-modal et caractérisé par un écart-type géométrique $\sigma_g = 1,5$. Les conditions correspondent à un travail standard pour une personne respirant par le nez, comme pour la figure 3.4. Les particules sont considérées comme sphériques ($\chi = 1$) et de masse volumique $\rho_p = \rho_0 = 1 \text{ g/cm}^3$. Les calculs des fractions déposées ont été effectués à l'aide du logiciel LUDEP (2000).

représentent respectivement les doses relatives pour les régions alvéolaire (ALV) et thoracique (TB + ALV). On peut observer, par exemple, que pour un aérosol de DM = 50 nm, la dose (dépôt) thoracique est près de 4 fois supérieure à celle pour l'aérosol de DM = 5 μm . La dose (dépôt) alvéolaire est près de 2,5 fois supérieure à celle pour l'aérosol de DM = 5 μm . Ceci démontre que l'on ne peut considérer que le niveau de risque (dans le cas de particules toxiques) est identique entre les différentes situations d'exposition, même si, suivant l'approche conventionnelle, on considère qu'il l'est.

Si les critères d'échantillonnage actuels (inhalable, thoracique et alvéolaire) ont effectivement apporté une amélioration dans le domaine de l'évaluation des expositions, ils ne sont pas complètement satisfaisants puisque, comme l'indique la figure 3.11, l'existence de différences entre fraction pénétrante et fraction déposée dans une même région des voies respiratoires semble inévitablement engendrer des biais plus ou moins importants en termes d'évaluation des doses pour la santé. Le débat pour décider si l'évaluation des

expositions doit se faire sur des critères de pénétration plutôt que de dépôt n'est pas récent pour les particules microniques (Vincent, 2005). Quoi qu'il en soit, en ce qui concerne les particules ultra-fines, il semble nécessaire d'intégrer un critère de dépôt et non de pénétration (McCawley, 1999 ; Esmen et coll., 2002). Deux approches peuvent alors être envisagées pour l'échantillonnage de l'aérosol :

- l'utilisation d'un instrument dont les performances répondraient à un nouveau critère d'échantillonnage ;
- la caractérisation en taille et en concentration de la fraction submicronique de l'aérosol ambiant et l'estimation par le calcul de la fraction déposée.

Si l'on peut imaginer une instrumentation susceptible de répondre à la première approche, il n'existe pas encore de critères faisant unanimement référence. La deuxième approche semble plus facile à mettre en place car les outils de calcul validés pour le dépôt dans les voies respiratoires existent déjà. C'est, par exemple, le cas du modèle de la CIPR. Rappelons que cette dernière approche est utilisée dans divers pays d'Europe [dont la France, décret (2003)] pour l'évaluation de la fraction de dose interne liée à l'inhalation d'aérosols radioactifs sur les lieux de travail.

Partant du constat qu'il existe essentiellement deux sites spécifiques cibles du dépôt des particules ultra-fines, Vincent (2005) a proposé deux critères en lien avec les effets potentiels sur la santé pour caractériser les particules de diamètres $dv < 100$ nm. Ils concernent les fractions déposées, le premier dans la région nasale (F_{DRN}), le second dans la région alvéolaire (F_{DRA}). Il n'est naturellement pas fait mention de l'inhalabilité puisque, comme vu précédemment, celle-ci est de 100 % pour les diamètres submicroniques. Exprimés suivant une forme mathématique similaire à celle des critères d'échantillonnage thoracique et alvéolaire, les critères proposés s'expriment par (Vincent, 2005) :

$$F_{DRN}(dv) = A \cdot [1 - F_{DRN}(dv)] \quad \text{et} \quad F_{DRA}(dv) = B \cdot [1 - F_{DRA}(dv)]$$

où A et B sont des facteurs dont les valeurs sont données dans le tableau 3.VI ; $F_{DRN}(dv)$ et $F_{DRA}(dv)$ sont des fonctions de probabilité log-normales cumulées pour lesquelles les valeurs des diamètres médians DM et écarts-types géométriques sont aussi données. La figure 3.12 montre la fonction $F_{DRN}(dv)$ proposée par Vincent (2005) ainsi que la courbe de dépôt calculée avec le modèle de la CIPR (travail standard). On peut observer que la courbe de Vincent n'est pas satisfaisante, puisqu'en deçà de 5 nm environ elle passe en dessous de la courbe de dépôt. D'autres valeurs des paramètres de la fonction $F_{DRN}(dv)$ sont donc ici proposées (tableau 3.VI) ; la nouvelle courbe reste au-dessus de la courbe de dépôt.

La figure 3.13 montre la fonction $F_{DRA}(dv)$ calculée proposée par Vincent (2005) ainsi que la courbe de dépôt calculée avec le modèle de la CIPR (travail standard). D'autres valeurs de paramètres pour la fonction $F_{DRA}(dv)$ sont également ici proposées afin de

Référence	$F_{DRN}(dv)$			$F_{DRA}(dv)$		
	A	DM	σ_g	B	DM	σ_g
Vincent (2005)	0,4	0,015	3,3	1	0,050	3,3
Ce travail	2	0,001	9,5	1	0,030	5,0

Tableau 3.VI. Valeurs des facteurs pour les critères d'échantillonnage des particules ultra-fines.

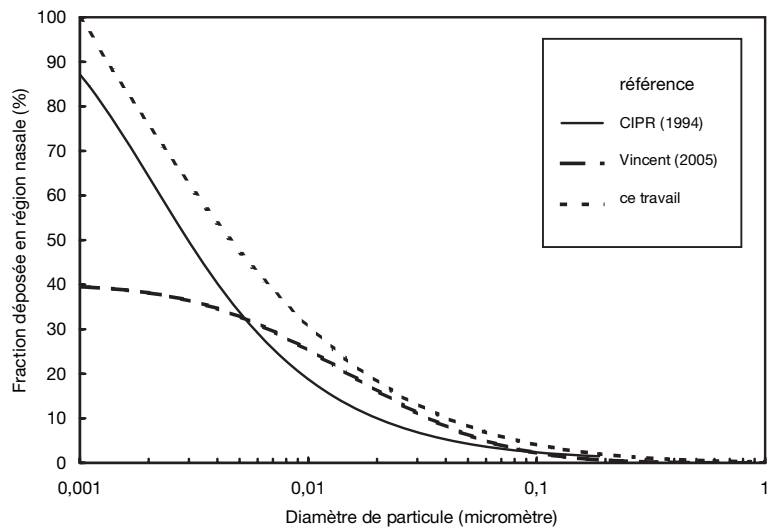


Figure 3.12. Fraction déposée dans la région nasale suivant le modèle de la CIPR et courbes selon les nouveaux critères proposés pour la fraction déposée dans la région nasale $F_{DRN}(dv)$. Les conditions correspondent à un travail standard pour une personne respirant par le nez, comme pour la figure 3.4. Les particules sont considérées comme sphériques ($\chi = 1$) et de masse volumique $\rho_p = \rho_0 = 1 \text{ g/cm}^3$. Les calculs de la fraction déposée ont été effectués à l'aide du logiciel LUDEP (2000).

minimiser l'écart entre la courbe de Vincent et la courbe de dépôt ; la nouvelle courbe est plus proche de la courbe de dépôt. Les valeurs des paramètres sont données dans le tableau 3.VI.

La figure 3.14 regroupe les critères d'échantillonnage existant pour les fractions inhalable, thoracique et alvéolaire (qui font l'objet de la norme NF EN 481 et sont basés sur une approche de pénétration) et les deux courbes proposées comme critères pour déterminer la fraction déposée en région nasale F_{DRN} et en région alvéolaire F_{DRA} .

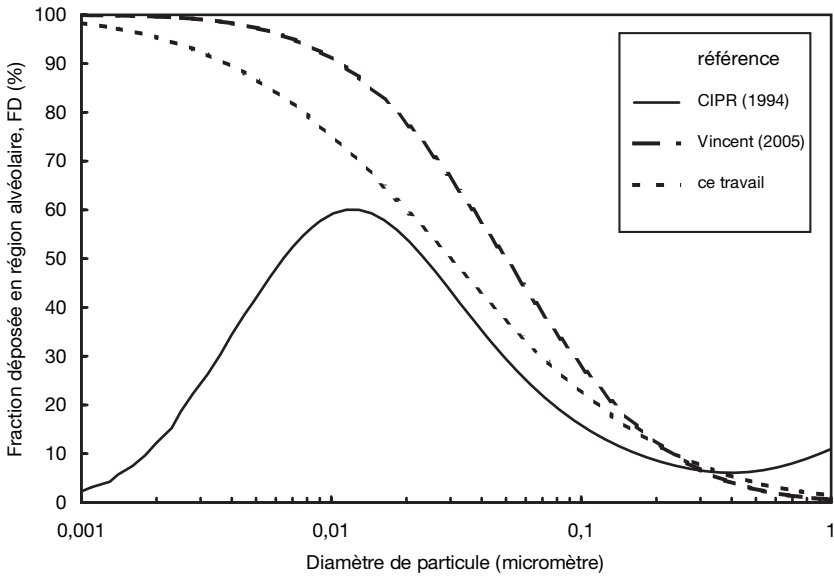


Figure 3.13. Fraction déposée dans la région alvéolaire suivant le modèle de la CIPR et courbes selon les nouveaux critères proposés pour la fraction déposée dans la région alvéolaire $F_{DRA}(dv)$. Les conditions correspondent à un travail standard pour une personne respirant par le nez, comme pour la figure 3.4. Les particules sont considérées comme sphériques ($\chi = 1$) et de masse volumique $\rho_p = \rho_0 = 1 \text{ g/cm}^3$. Les calculs de la fraction déposée ont été effectués à l'aide du logiciel LUDEP (2000).

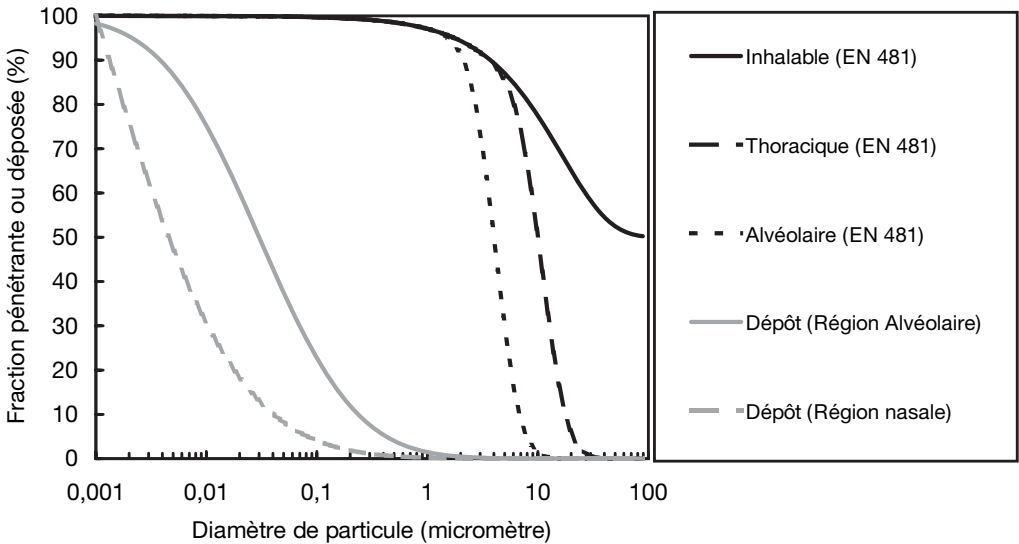


Figure 3.14. Courbes conventionnelles décrivant les fractions inhalable, thoracique et alvéolaire (EN 481) et courbes proposées comme critères pour les fractions déposées dans les régions alvéolaires et nasales.

Conclusion

En conclusion, dans le domaine de la recherche en santé au travail, notamment pour ce qui se rapporte à l'évaluation de l'exposition aux PUF, le sujet des dépôts dans les voies respiratoires est primordial. Une première raison en est que la dose délivrée aux voies respiratoires (quantité de particules inhalées déposées) est un facteur clé de l'évaluation des effets potentiels. Une seconde raison est que – à part le cas de certains aérosols radioactifs – il est impossible de mesurer cette dose directement. En pratique, l'évaluation de cette dose peut être faite par des mesures adaptées des particules dispersées dans l'air (granulométrie, concentration) suivi d'un calcul de dépôt à l'aide d'un modèle validé, dont certaines des données d'entrées proviennent des mesures effectuées.

Bibliographie

- Aitken RJ, Baldwin PEJ, Beaumont GC, Kenny LC, Maynard AD (1999). Aerosol inhalability in low air movement environments. *J Aerosol Sci* **30**, 613-626.
- Asgharian B (2004). A model of deposition of hygroscopic particles in the human lung. *Aerosol Sci Technol* **38**, 938-947.
- Baron PA, Willeke K (2001). Aerosol fundamentals. In: *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications*. 2nd Edition, Baron PA, Willeke K. (Ed.) Wiley Intersciences, Inc, New York, USA, 45-97.
- Broday, D.M, Georgopoulos, P.G (2001). Growth and deposition of hygroscopic particulate matter in human lungs. *Aerosol Sci Technol* **34**, 144-159.
- Brown JS, Wilson WE, Grant JD (2005). Dosimetric comparisons of particle deposition and retention in rats and humans. *Inhal Toxicol* **17**, 355-385.
- Brown JS, Zeman KL, Bennett WD (2002). Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med* **166**, 1240-1247.
- Cheng YS (2003). Aerosol deposition in the extrathoracic region. *Aerosol Sci Technol* **37**, 659-671.
- CIPR (1994). Commission internationale de protection radiobiologique. Publication 66 : Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. Oxford, Pergamon, 24, n° 1-3, 482 p.
- CND (Cahiers de notes documentaires). Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France. INRS. 2^e édition. ND 2098
- Cohen BS, Xiong JQ, Ashagarian B, Ayres L (1995b). Deposition of inhaled charged ultrafine particles in a simple tracheal model. *J Aerosol Sci* **7**, 1149-1160.
- Cohen BS, Xiong JQ, Li W (1995a). The influence of charge on the deposition behavior of aerosol particles with emphasis on singly charged nanometer sized particles. In: *Aerosol Inhalation: Recent Research Frontiers*. Marijnissen JCM and Gradon L (Ed.) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Hollande, 153-164.

- Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, Frampton MW (2003). Ultra-fine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhal Toxicol* **15**, 539-552.
- Décret (2003) n° 2003-296 du 31 mars 2003 relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants. J.O. n° 78 du 2 avril 2003, p. 5779.
- Esmen NA, Johnson DL, Agron GM (2002). The variability of delivered dose of aerosols with the same respirable concentration but different size distributions. *Annals Occup Hyg* **46**, 401-407.
- Hoffmann W, Golser R, Balashazy I (2003). Inspiratory deposition efficiency of ultrafine particles in a human airway bifurcation model. *Aerosol Sci Technol* **37**, 988-994.
- Jaques PA, Kim CS (2000). Measurement of total lung deposition of inhaled ultrafine particles in healthy men and women. *Inhal Toxicol* **12**, 715-731.
- Kelly JT, Asgharian B, Kimbell JS, Wong BA (2004a). Particle deposition inhuman nasal airway replicas manufactured by different methods, part II: Ultrafine particles. *Aerosol Sci Technol* **38**, 1072-1079.
- Kelly JT, Asgharian B, Kimbell JS, Wong BA (2004b). Particle deposition inhuman nasal airway replicas manufactured by different methods, part II: Inertial regime aerosols. *Aerosol Sci Technol* **38**, 1063-1071.
- Kim CS, Jaques PA (2000). Respiratory dose of inhaled ultrafine particles in healthy adults. *Phil Trans R Soc Lond A* **358**, 2693-2705.
- Kim CS, Jaques PA (2004). Analysis of total deposition of inhaled ultrafine particles in adult subjects at various breathing patterns. *Aerosol Sci Technol* **38**, 525-540.
- Kim CS, Jaques PA (2005). Total lung deposition of ultrafine particles in elderly subjects during controlled breathing. *Inhal Toxicol* **17**, 387-399.
- Lippmann M (2001). Size-selective health hazard sampling. In: *Air Sampling Instruments for evaluation of atmospheric contaminants*. 9th Edition. Cohen BS. and McCammon CS. ACGIH, Cincinnati, Ohio, 94-134.
- LUDEP (2000). Program for implementing the ICRP 66 Respiratory Tract Model, version 2.07, June 2000, Chilton, Didcot, OXON, NRPB, UK.
- Martinet Y (1995). Les moyens de défense de l'appareil respiratoire. In : *Les Maladies Respiratoires d'Origine Professionnelle*. Martinet Y et Anthoine D, éditeurs, Masson, Paris, France, 15-27.
- Martonen TB, Rosati JA, Isaacs KK (2005). Modeling deposition of inhaled particles. In: *Aerosols Handbook. Measurement, Dosimetry, and Health Effects*. Ruzler LS and Harley NH (Ed.) CRC Press, New York, Etats-Unis, 113-155.
- McCawley MA (1999). Particle size-selective criteria for deposited submicrometer particles. In: *Particle Size-Selective Sampling for Particulate Air Contaminants*. Vincent JH (ed.) Cincinnati, ACGIH, 211-223.
- McClellan (2001). Particle Interaction with the Respiratory Tract. In: *Particle-Lung Interactions*. Gehr P and Heyder J (Ed.) Marcel Dekker AG, Bâle, Suisse, 3-63.
- Morowska L, Hofmann W, Hitchins-Loveday J, Swanson C, Mengersen K (2005). Experimental study of the deposition of combustion aerosols in the human respiratory tract. *J Aerosol Sci* **36**, 939-957.

- NCRP (1997). National Council on Radiation Protection and Measurements. Deposition, retention and dosimetry of inhaled radioactive substances. Report 125, Bethesda, MD, USA, 253 pages.
- NF EN 481 (X43-276) – Atmosphères des lieux de travail. Définitions des fractions de taille pour le mesurage des particules en suspension dans l'air. Paris, AFNOR, novembre 1993, 16 pages.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* **16**, 437-445.
- Phalen RF (1999). Airway anatomy and physiology. In: *Particle Size-Selective Sampling for Particulate Air Contaminants*. Vincent JH (Ed.) Cincinnati, ACGIH, 29-50.
- RIVM (2002). National Institute for Public Health and the Environment. Multiple path particle dosimetry model (MPPD v1.0): a model for human and rat airway particle dosimetry. Bilthoven, The Netherlands. RIVA Report 650010030.
- Smith S, Cheng YS, Yeh HC (2001). Deposition of ultrafine particles in human tracheobronchial airways of adults and children. *Aerosol Sci Technol* **35**, 697-709.
- Steinke H, Spannel-Borowski K (2006). Coloured plastinates. *Annals Anat* **188**, 177-182.
- Vincent JH (1995). Aerosol science for Industrial Hygienists. New York, Pergamon, 411 pages.
- Vincent JH (2005). Health-related aerosol measurements: a review of existing sampling criteria and proposals for new ones. *J Environ Monit* **7**, 1037-1053.
- Zhang Z, Kleinstreuer C, Donohue JF, Kim CS (2005). Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *J Aerosol Sci* **36**, 211-233.

2. Clairance pulmonaire.

Distribution et devenir dans l'organisme

D. Lison

La toxicité des particules inhalées dépend en partie de leur dépôt dans les voies respiratoires (emplacements et quantités, voir partie précédente), mais également de la capacité de ces dernières à les éliminer totalement ou partiellement (processus de clairance). La translocation vers un autre site de l'organisme constitue une autre option qui déterminera éventuellement la survenue d'effets toxiques systémiques.

La particule inhalée et déposée dans les voies respiratoires peut tout simplement être dissoute dans les fluides biologiques (mucus, fluide de surface épithéliale ; voir chapitre 1, point 5.1) menant à l'absorption locale et éventuellement systémique des différents constituants solubilisés (hydrocarbures aromatiques polycycliques, métaux).

Les mécanismes de clairance (non absorbants) qui, selon le degré de solubilité des particules, peuvent aller de pair avec un phénomène de dissolution, diffèrent selon l'étage respiratoire considéré.

2.1. Tractus respiratoire supérieur

La clairance des particules insolubles s'effectue principalement par transport mucociliaire en direction du nasopharynx (système digestif) ou de l'extérieur (éternuement, mouchage). Il s'agit, chez l'homme, d'un processus rapide (20-30 min). Les particules solubles y subissent une absorption systémique rapide et importante, eu égard à la riche vascularisation de la muqueuse nasale.

2.2. Arbre trachéobronchique

Les particules insolubles y sont principalement éliminées par transport mucociliaire en direction de l'oropharynx. La vitesse de ce transport croît des bronches distales ($\sim \mu\text{m}/\text{min}$) vers la trachée (quelques mm/min). La cinétique de ce processus est identique quelle que soit la nature (taille, composition, forme) des particules déposées ; cependant, le temps nécessaire pour éliminer les particules plus fines est en général plus long, puisque celles-ci se déposent plus profondément dans les voies respiratoires. Chez l'homme, en moyenne, on admet que 99 % des particules déposées dans l'étage trachéobronchique sont éliminées après 48 heures (Bailey et coll., 1982). Certaines particules insolubles sont susceptibles de traverser l'épithélium, grâce à des processus d'endocytose, atteignant ainsi les régions périlobulaires (Masse et coll., 1974). Les macrophages bronchiques, localisés à la surface de la couche de mucus ou au-dessous de celle-ci, sont également susceptibles de phagocyter certaines particules insolubles.

La bronchite chronique, l'asthme, la mucoviscidose et l'exposition à des irritants respiratoires (par exemple dioxyde de soufre), mais surtout le tabagisme, sont susceptibles de réduire l'efficacité des processus de clairance trachéobronchique.

2.3. Région alvéolaire

Les macrophages alvéolaires prennent en charge la majeure part de la clairance des particules déposées au niveau des alvéoles pulmonaires. Ce processus est rapide (quelques heures) mais saturable.

Chez le rat, on décrit un phénomène de surcharge qui survient en particulier lors d'expériences d'inhalation chronique, et se caractérise par une altération de la clairance par les macrophages alvéolaires (Morrow, 1992). Chez le rat F344, cet état s'installe lorsque la charge pulmonaire totale excède 1 mg par gramme de poumon. On observe alors une cessation quasi complète de la clairance pulmonaire, l'apparition d'agrégats de macrophages alvéolaires engorgés de particules et apparemment immobilisés, un état inflammatoire chronique, une accumulation accrue de particules dans l'interstitium alvéolaire,

de même qu'une hyperplasie des pneumocytes. L'état de surcharge s'accompagne du développement d'une alvéolite, de granulomes, de fibrose interstitielle et d'une incidence accrue de tumeurs pulmonaires. Cette réaction ne semble pas spécifique d'un type de particules et a été observée après administration de doses excessives de particules dites « inertes » (par exemple TiO_2 , fer, noir de carbone). Morrow (1988) a calculé qu'un état de surcharge survenait lorsqu'en moyenne la dose accumulée dans le poumon dépasse $60 \mu\text{m}^3$ par macrophage alvéolaire ; cette estimation est toutefois très théorique, car on sait que la distribution des particules est très hétérogène au sein d'une population de macrophages alvéolaires. Ce phénomène de surcharge ne semble pas survenir dans d'autres espèces, comme la souris ou le hamster. L'interprétation actuelle est qu'il s'agit d'une réponse liée à l'utilisation de doses excessives ; l'extrapolation à l'homme de ces manifestations toxiques, en particulier du risque cancérogène, est encore débattue (ILSI Workshop, 2000). Ce processus de surcharge a également été décrit pour une exposition à des particules ultra-fines. Dans une étude comparant la réponse pulmonaire chez le rat, la souris et le hamster suite à l'inhalation de PUF de TiO_2 (25 nm, 10 mg/m^3 pendant 13 semaines), Bermudez et coll. (2004) ont observé une surcharge chez le rat, et dans une moindre mesure chez la souris, mais pas chez le hamster.

Il est intéressant de noter que le recrutement de ces macrophages alvéolaires augmente proportionnellement avec le nombre (et non la masse) de particules déposées dans les alvéoles, ceci jusqu'à un maximum représentant probablement un point de saturation (Adamson et coll., 1981). Pour une masse égale, des particules de plus petite dimension (par exemple PUF) entraîneront donc un recrutement cellulaire plus important. La phagocytose des particules par les macrophages est un phénomène rapide, pour autant que les particules ne soient pas cytotoxiques ou de taille trop importante. En général, après une inhalation unique, la majorité des particules sont phagocytées par les macrophages alvéolaires en 24 heures (Schlessinger, 1995). Il a toutefois été montré que des PUF ($< 20 \text{ nm}$) sont moins rapidement phagocytées par les macrophages alvéolaires que des particules fines (Oberdörster, 1993 ; Renwick et coll., 2001). Il en résulte que les PUF libres persistent plus longtemps dans l'alvéole pulmonaire et ont une probabilité plus grande d'être endocytées par les cellules épithéliales et transférées vers l'interstitium. La durée de résidence (biopersistence) de ces PUF dans le poumon s'en trouve ainsi substantiellement accrue. Chez le rat, après une exposition de 12 semaines à des particules de TiO_2 , la clairance pulmonaire des particules ultra-fines (21 nm) était nettement plus lente ($T_{1/2}$ 501 jours) que celle des particules fines (250 nm ; $T_{1/2}$ 174 jours ; Ferin et coll., 1992). Dans les mêmes conditions, la clairance d'une particule test (polystyrène marquée au ^{85}Sr) était significativement réduite (0,6 et 0,13 % par jour, respectivement pour les fines et ultra-fines) comparativement aux animaux témoins (1 % par jour ; Oberdörster et coll., 1994).

Hofmann et coll. (2003) ont élaboré un modèle mathématique de clairance de PUF insolubles dans les voies respiratoires. Ils indiquent que, durant les premières heures après

inhalation de PUF, celles ayant un diamètre de 1 nm seraient éliminées plus rapidement que celles de 10 à 100 nm. Pour ces auteurs, les phénomènes de transcytose (transfert *via* l'épithélium vers le sang, le système lymphatique, ou accumulation cellulaire) constituent le mode dominant d'élimination des PUF ; les particules de 1-10 nm seraient rapidement transférées vers le sang tandis que l'accumulation dans les cellules épithéliales constituerait le mécanisme préférentiel pour les particules de 10-100 nm.

In vitro, il a été montré que la capacité de cellules J774 (lignée macrophagique) à phagocyter des particules de latex (2 μm) était modifiée par une pré-incubation avec des particules fines (~ 250 nm) ou ultrafines (~ 20 nm) de noir de carbone ou de TiO_2 . Alors qu'à faible dose (10 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$), on observait une stimulation de la phagocytose, une réduction était enregistrée à plus forte dose (> 100 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$; Renwick et coll., 2001 ; Hoet et coll., 2001). Ces phénomènes s'observaient tant avec les particules fines qu'ultra-fines et ne paraissaient donc pas spécifiques des PUF.

Il a également été montré *in vitro* que des PUF (TiO_2 , noir de carbone, particules diesels, particules urbaines) causent un dysfonctionnement du cytosquelette des macrophages, entraînant une réduction de la prolifération cellulaire, de la capacité de phagocytose, une capacité de transport intracellulaire réduite qui, de concert, peuvent contribuer à altérer les capacités de défense du poumon (Lundborg et coll., 2001, 2006 ; Möller et coll., 2002 ; Calcabrini et coll., 2004).

De manière contradictoire, la clairance de particules insolubles ultrafines d'iridium marqué (15-20 nm) mesurée sur une période de 6 mois après une exposition unique de 1-1,5 heure (0,2 mg/m^3) chez le rat, n'était pas différente de la cinétique d'élimination rapportée dans des publications utilisant des particules micrométriques (polystyrène marqué ou fluorescent). Cette dernière étude est cependant difficile à interpréter, entre autres parce qu'aucune information n'est fournie sur les éventuelles lésions induites par l'administration de PUF d'iridium. L'élimination des particules se faisait principalement par excrétion fécale et aucune évidence d'une translocation significative des particules vers d'autres organes après l'arrêt de l'exposition n'a pu être apportée (Kreyling et coll., 2002 ; Semmler et coll., 2004).

Une autre étude réalisée chez le rat avec des PUF d'argent élémentaire relativement insolubles (15 nm) a montré que, suite à une exposition unique de 6 heures (133 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), l'élimination pulmonaire mesurée par ICP-MS était rapide puisque seulement 4 % de la charge initiale était retenue après 7 jours. On retrouvait également des taux élevés d'Ag dans le sang, la cavité nasale et les ganglions lymphatiques thoraciques. Une cinétique d'élimination similaire était observée après l'instillation intratrachéale d'une dose de nitrate d'argent (complètement soluble ; Takenaka et coll., 2001). Malheureusement, la présence éventuelle de lésions causées par l'administration de ces composés n'est pas plus documentée dans ces études, ne permettant pas d'interpréter correctement les données.

Chez 3 sujets sains, Roth et coll. (1994, cité dans Brown et coll., 2002) ont montré que, suite à l'inhalation d'un aérosol d'oxyde d'indium (18 nm), la clairance pulmonaire totale était de l'ordre de 7 % sur une période de 24 heures.

Brown et coll. (2002) n'ont pas observé de différence de clairance entre 10 patients bronchitiques chroniques et 9 sujets sains, suivis pendant 2 heures après l'inhalation d'une dose unique d'un aérosol ultrafin (33 nm) marqué au technetium métastable (^{99m}Tc), ainsi que 24 heures plus tard. Après 24 heures, ils observaient un taux de rétention pulmonaire total de l'ordre de 85 % dans les 2 groupes de sujets (Brown et coll., 2002).

La dissolution locale des particules (dans l'alvéole, l'interstitium ou le système lymphatique) sera, entre autres, dépendante de la solubilité chimique du composé, mais également de la surface spécifique des particules. Des particules dont le rapport surface/volume est élevé (comme c'est le cas pour les PUF) seront donc plus rapidement solubilisées. Le pH local est un autre déterminant de la dissolution des particules inhalées. Le pH acide des phagolysosomes des macrophages favorise la dissolution des métaux (Lundborg et coll., 1992 ; Harper et coll., 1994 ; voir chapitre 1, point 5.1).

La cinétique de clairance au niveau alvéolaire varie selon le processus impliqué : demi-vie de 2-6 semaines pour l'élimination par les macrophages, de quelques mois pour la migration interstitielle et plusieurs mois, voire des années, pour la dissolution des particules relativement insolubles. Dans l'ensemble, la clairance de particules inertes et insolubles, chez un individu sain et non fumeur, suit une cinétique biphasique, avec une première phase rapide ($T_{1/2}$ de quelques jours) et seconde plus lente ($T_{1/2}$ de plusieurs centaines de jours).

2.4. Distribution et translocation

Les macrophages chargés de particules peuvent quitter la région pulmonaire selon plusieurs voies : le transport mucociliaire trachéobronchique, la migration dans l'interstitium et, de là, vers le système lymphatique pour aboutir dans les ganglions locorégionaux et finalement la circulation systémique, ou éventuellement un passage vers la circulation sanguine en traversant la barrière alvéolo-capillaire (Holt, 1981). Des particules libres peuvent également passer dans le compartiment sanguin systémique après avoir été endocytées par les cellules endothéliales et fait l'objet d'une exocytose dans la lumière capillaire. Ceci semble en principe limité à des particules de faible dimension ($< 0,1 \mu\text{m}$; Lee et coll., 1985 ; Oberdörster, 1988) et serait donc particulièrement pertinent pour les PUF.

D'autres particules, notamment de très fines fibres d'amiante (Chiappino, 2005), peuvent migrer vers les espaces pleuraux et se concentrer en certaines localisations dénommées « *black spots* » (Boutin et coll., 1996 ; Mitchev et coll., 2002).

Enfin, des particules peuvent également pénétrer l'interstitium *via* des processus d'endocytose par les pneumocytes de type I. Ce processus semble prendre une part importante lorsque la dose inhalée est élevée et que les macrophages alvéolaires sont saturés. On a montré que ce processus d'endocytose par les pneumocytes était quantitativement plus important pour des PUFs insolubles (< 50 nm) qui ont alors un accès accru vers le système lymphatique (Oberdörster et coll., 1992).

Au cours des processus de clairance, des particules peuvent également subir une redistribution entre les populations de macrophages alvéolaires, notamment lorsqu'elles sont cytotoxiques, et sont alors rephagocytées par d'autres macrophages ou par des cellules épithéliales.

Un état inflammatoire (alvéolite), et notamment la présence de granulocytes neutrophiles, peut contribuer à accélérer la clairance alvéolaire des particules (Adamson et coll., 1994, 1992).

La possible translocation des PUF vers d'autres localisations extrapulmonaires constitue le sujet de nombreuses recherches qui, jusqu'ici, n'ont apporté que des conclusions fragmentaires et parfois contradictoires.

Au début des années 1950, Biozzi et coll. (1953) avaient déjà montré que le foie et la rate constituaient les deux principaux organes de distribution de PUF circulantes. En effet, après injection intraveineuse de PUF de carbone (25 nm) chez le rat, celles-ci s'accumulaient principalement dans le foie (85 %) et la rate (15 %). Plusieurs auteurs ont depuis lors confirmé ces observations : chez la dinde après injection intraveineuse de particules d'or colloïdal marqué (McEntee et coll., 1990), chez la souris après injection intraveineuse de particules de polystyrène amino-modifié (100-1 000 nm ; Simon et coll., 1995), ou chez le rat après injection intraveineuse de nanoparticules de polystyrène (50 nm ; Ogawara et coll., 1999, 2002).

La question principale est cependant de savoir si des PUF inhalées sont susceptibles d'être transloquées dans la circulation systémique et/ou d'autres organes après s'être déposées dans les voies aériennes. Plusieurs études utilisant des PUF métalliques (platine, indium) ont montré un certain degré de distribution hépatique de l'élément (au maximum quelques % de la dose administrée) après inhalation chez le rat (Semmler et coll., 2004 ; Takenaka et coll., 2001). Cependant, il n'est pas aisé de déterminer si la quantité accumulée au niveau hépatique représente réellement des particules intactes, ou une fraction solubilisée à partir des particules pulmonaires. Utilisant des PUF (20-29 nm) de carbone marqué au ^{13}C insoluble, Oberdörster et coll. (2002) ont confirmé chez le rat la translocation de ces particules au niveau hépatique dans les heures qui suivaient une exposition corps entier de 6 heures (80 ou 180 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Après 18 et 24 h, les niveaux hépatiques de ^{13}C étaient même supérieurs aux niveaux mesurés dans les poumons. Pour expliquer cette accumulation hépatique très importante, les auteurs ont suggéré une absorption digestive de particules, notamment en raison du fait que,

contrairement aux expériences mentionnées précédemment, les animaux étaient exposés « corps entier » et pouvaient par exemple se lécher le pelage contaminé.

Meiring et coll. (2005) pensent que la translocation pulmonaire peut emprunter diverses voies cellulaires, telles que puits à clathrine, pinocytose, ou encore cavéoles. Ces dernières seraient la voie utilisée par les nanoparticules d'iridium (taille 18 nm ; modèle de poumon de lapin isolé perfusé). Comme Nemmar et coll. (2005), ils ont observé que la présence d'histamine (qui accroît la perméabilité microvasculaire) induisait le passage de nanoparticules des poumons vers la circulation sanguine (même modèle expérimental, particules de polystyrène fluorescent de tailles 24, 110 ou 190 nm). Heckel et coll. (2004) ont montré que 7 % de nanoparticules d'or colloïdal (taille 4 nm) étaient internalisées par les cellules endothéliales et épithéliales du poumon (lapin blanc néo-zélandais) ; après infusion de lipopolysaccharide provoquant un léger œdème pulmonaire, le passage transendothélial était multiplié par un facteur 5, alors que 14 % des particules s'accumulait dans l'interstitium et 11 % atteignait les alvéoles. La voie d'internalisation dépend étroitement de la taille, les particules de taille supérieure à 200 nm ne passant pratiquement pas par les puits à clathrine (Rejman et coll., 2004). Pour des nanoparticules d'or non agrégées (tailles de 14 à 100 nm) recouvertes de lécithine ou d'un stabilisant à base d'acide citrique, l'internalisation par des cellules HeLa dépendait à la fois de leur taille (maximum pour 50 nm, pour des particules sphériques ; Osaki et coll., 2004), de leur forme (40 × 14 nm ou 74 × 14 nm) et de leur revêtement. Le nombre maximal de particules de 50 nm internalisées (6 160) était plus de 2 fois celui pour 14 nm ou 74 nm (3 000 ; Chithrani et coll., 2006).

Chez le hamster, suite à l'instillation intratrachéale de particules d'albumine nanocolloïdales marquées au ^{99m}Tc (< 80 nm), Nemmar et coll. (2001) ont détecté une diffusion de la radioactivité vers le sang périphérique de l'ordre de quelques % de la dose totale dès 5 minutes après l'administration. Pour exclure la possibilité que cette diffusion soit le reflet d'une dissolution des particules, ils ont montré par chromatographie en couche mince qu'un échantillon sanguin avait le même profil de migration que des particules de ^{99}Tc -albumine fraîchement préparées. En outre, à l'instar des observations effectuées avec d'autres PUF après injection intraveineuse (voir ci-dessus), les auteurs ont observé une accumulation de la radioactivité au niveau hépatique, qu'ils interprètent comme l'accumulation des particules au niveau des cellules de Küpffer.

Chez l'homme (5 volontaires sains), ces mêmes auteurs ont montré que, suite à l'inhalation (3 à 5 bouffées) de nanoparticules de carbone marquées au ^{99m}Tc (< 100 nm, particules individuelles 5-10 nm, Technegas), la radioactivité se distribue rapidement (dès la première minute) au niveau sanguin, et y persiste durant 60 minutes. La chromatographie des échantillons sanguins montrait deux espèces : une forme libre qui migrerait avec le solvant, correspondant au pertechnétate (TcO_4^-) soluble, l'autre correspondant au Tc lié aux particules, qui ne migrerait pas. Une accumulation de radioactivité dans plusieurs organes dans le décours de l'inhalation était compatible avec l'existence

concomitante de radioactivité soluble (TcO_4^- , vessie, thyroïde) et particulaire (foie ; Nemmar et coll., 2002). Mills et coll. (2006) ont contesté ces conclusions, observant, selon le même mode opératoire, que rien ne permet de mettre en évidence un passage notable de particules dans l'organisme, la radioactivité observée en dehors des poumons n'étant liée, selon eux, qu'à la formation de pertechnétate soluble (peut-être due à une contamination du générateur par l'oxygène de l'air), non liée à la particule. Telles sont également les conclusions de Geiser et coll. (2006) et de Wiebert et coll. (2006a, b) après quelques améliorations techniques portant sur la stabilité du marquage des particules et leur domaine de tailles.

Utilisant des nanoparticules d'or (5 à 8 nm, peu agglomérées), Takenaka et coll. (2006) trouvent qu'elles sont majoritairement retenues au niveau pulmonaire, et mettent en évidence une certaine internalisation par les cellules épithéliales pulmonaires de type I. Une faible translocation par voie sanguine a été observée (0,06 % de la concentration pulmonaire dans le sang).

Nemmar et ses collègues ont par la suite montré que la translocation de nanoparticules du poumon vers le compartiment sanguin était associée à l'activation de la coagulation, chez le hamster (Nemmar et coll., 2004).

Des chercheurs italiens ont également examiné en microscopie électronique le tissu et les thrombi adhérant détachés de dispositifs placés dans la veine cave inférieure de différents patients souffrant de troubles de la coagulation (afin de prévenir le risque d'embolie pulmonaire). Ces échantillons contenaient de multiples particules de taille nanométrique contenant du bismuth, du plomb, du tungstène ; les auteurs ont suggéré que la présence de ces nanoparticules dans la circulation pourrait être mise en rapport avec les troubles de la coagulation (Gatti et coll., 2004).

L'épithélium olfactif et les nerfs olfactifs et crâniens constituent des voies possibles de translocation des nanoparticules vers les structures cérébrales.

Des travaux anciens avaient déjà montré que l'épithélium et les nerfs olfactifs constituaient des voies d'entrée pour les particules du virus de la polio chez le singe (Bodian et coll., 1941). Plus récemment, il a été montré chez le singe écureuil que des particules d'or colloïdal (50 nm) administrées par voie intranasale étaient transloquées de manière antérograde vers les bulbes olfactifs par les axones du nerf olfactif. La présence des nanoparticules dans les axones put être démontrée par une analyse en microscopie électronique, et les auteurs ont calculé une vitesse de transport neuronal de ces particules de l'ordre de 2,5 mm/heure (De Lorenzo, 1970).

Oberdörster et coll. (2004) ont montré que, suite à l'inhalation de nanoparticules de ^{13}C (36 nm, $160 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pendant 6 h), ces particules se distribuaient, chez le rat, au niveau des bulbes olfactifs dès 24 heures après l'exposition et persistaient durant au moins 7 jours. La quantité de nanoparticules transloquées vers les bulbes olfactifs

correspondait à environ 20 % de la dose déposée au niveau de l'épithélium olfactif (voir chapitre 3 point 4).

Dans le domaine pharmaceutique, les chercheurs s'intéressent aux nanoparticules qui pourraient servir de « cheval de Troie » pour l'administration de certains médicaments. L'utilité de nanoparticules de différents polymères (polystyrène, polycyanoacrylate, polyéthylène glycol...) ou de protéines (par exemple albumine) est investiguée pour tenter d'accroître la stabilité (peptides) et l'absorption (substances insolubles) de différents médicaments en administration orale. Les mécanismes de l'absorption de ces nanoparticules au niveau de l'épithélium digestif sont cependant encore très mal caractérisés. Des efforts sont également réalisés pour améliorer le passage de la barrière hémato-encéphalique par certains médicaments, grâce à l'utilisation de nanoparticules (Kreuter, 2004). D'autres nanoparticules sont utilisées pour accroître le passage transcutané de substances actives (Cappel et coll., 1991 ; Shim et coll., 2004).

Bibliographie

- Adamson IY, Bowden DH (1981). Dose response of the pulmonary macrophagic system to various particulates and its relationship to transepithelial passage of free particles. *Exp Lung Res* **2**, 165-175.
- Adamson IY, Frieditis H, Bowden DH (1992). Instillation of chemotactic factor to silica-injected lungs lowers interstitial particle content and reduces pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **141**, 319-326.
- Adamson IY, Frieditis H, Bowden DH (1994). Enhanced clearance of silica from mouse lung after instillation of a leukocyte chemotactic factor. *Exp Lung Res* **20**, 223-233.
- Bailey MR, Fry FA, James AC (1982). The long-term clearance kinetics of insoluble particles from the human lung. *Ann Occup Hyg* **26**, 273-290.
- Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* **77**, 347-57.
- Biozzi G, Benacerraf B, Halpern B (1953) Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system. III: A study of the granuloplectic activity of the R.E.S. in relation to the dose of carbon injected. Relationship between the weight of the organ and their activity. *Br J Exp Pathol* **34**, 441-457.
- Bodian D, Howe RM (1941). The rate of progression of poliomyelitis virus in nerves. *Bull Johns Hopkins Hospl* **LXIX(2)** 79-85.
- Boutin C, Dumortier P, Rey F, Viallat JR, De Vuyst P (1996). Black spots concentrate oncogenic asbestos fibers in the parietal pleura. Thoracoscopic and mineralogic study. *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 444-449.
- Brown JS, Zeman KL, Bennett WD (2002). Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am. J Respir. Crit Care Med* **166**, 1240-1247.

- Calcabrini A, Meschini S, Marra M, Falzano L, Colone M, De Berardis B, Paoletti L, Arancia G, Fiorentini C (2004). Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. *Environ Res* **95**, 82-91.
- Cappel MJ, Kreuter J (1991). Effect of nanoparticles on transdermal drug delivery. *J Microencapsul* **8**, 369-374.
- Chiappino G (2005). Mesotelioma: il ruolo delle fibre ultrafini e conseguenti riflessi in campo preventivo e medico legale. *Med Lavoro* **96**, 3-23.
- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC (2006). Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **6** 662-668.
- De Lorenzo AJD (1970). The olfactory neuron and the blood-brain barrier. In: *Taste and smell in vertebrates* (GEW Wolstenholme and J Knight, Eds.), pp. 151-176. J&A Churchill, London.
- Ferin J, Oberdörster G, Penney DP (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**, 535-542.
- Gatti AM, Montanari S, Monari E, Gambarelli A, Capitani F, Parisini B (2004). Detection of micro- and nano-sized biocompatible particles in the blood. *J Mater Sci Mater Med* **15**, 469-72.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Gehr P, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Heyder J, Im Hof V (2006). Ultrafine Particles: Geiser et al. Respond. *Environ Health Perspect* **114** A212-A213. Correspondance en réponse à Nemmar A, Hoet PHM, Nemery B (2006). Translocation of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect* **114**, A211-A212.
- Hoet PH, Nemery B (2001). Stimulation of phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **176**, 203.
- Harper RA, Stirling C, Townsend KM, Kreyling WG, Patrick G (1994). Intracellular particle dissolution in macrophages isolated from the lung of the Fischer (F-344) rat. *Exp Lung Res* **20**, 43-56.
- Heckel K, Kieffmann R, Dörger M, Stoeckelhuber M, Goetz AE (2004). Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L867-L878.
- Hofmann W, Sturm R, Winkler-Heil R, Pawlak E (2003). Stochastic model of ultrafine particle deposition and clearance in the human respiratory tract. *Radiat Prot Dosimetry* **105**, 77-80.
- Holt PF (1981). Transport of inhaled dust to extrapulmonary sites. *J Pathol* **133**, 123-129.
- ILSI Workshop (2000) The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhal Toxicol* **12**, 1-17.
- Kreuter J (2004). Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol* **4**, 484-488.
- Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A (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**, 1513-1530.
- Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF (1985). Transmigration of titanium dioxide (TiO₂) particles in rats after inhalation exposure. *Exp Mol Pathol* **42**, 331-343.
- Lundborg M, Johard U, Lastbom L, Gerde P, Camner P (2001). Human alveolar macrophage phagocytic function is impaired by aggregates of ultrafine carbon particles. *Environ Res* **86** 244-253.

- Lundborg M, Falk R, Johansson A, Kreyling W, Camner P (1992). Phagolysosomal pH and dissolution of cobalt oxide particles by alveolar macrophages. *Environ. Health Perspect* **97**, 153-157.
- Lundborg M, Dahlen SE, Johard U, Gerde P, Jarstrand C, Camner P, Lastbom L (2006). Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. *Environ Res.* 100(2) 197-204.
- Masse R, Ducouso R, Nobile D et coll. (1974). Passage transbronchique des particules métalliques. *Rev Fr Mal Resp* **1**, 123-129.
- McEntee MF, Ficken, MD (1990). Blood clearance of radiolabeled gold colloid by the turkey mononuclear phagocytic system. *Avian Dis* **34**, 393-397.
- Meiring JJ, Borm PJA, Bagat K, Semmler M, Seitz J, Takenaka S, Kreyling WG (2005). The influence of hydrogen peroxide and histamine on lung permeability and translocation of iridium nanoparticles in the isolated perfused rat lung. *Particle Fibre Toxicol* **2**, 3.
- Mills NL, Amin N, Robinson SD, Anand A, Davies J, Patel D, de la Fuente JM, Cassee FR, Boon NA, Macnee W, Millar AM, Donaldson K, Newby DE (2006). Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am J Respir Crit Care Med.* **173** 426-431.
- Mitchev K, Dumortier P, De Vuyst P (2002). 'Black Spots' and hyaline pleural plaques on the parietal pleura of 150 urban necropsy cases. *Am J Surg Pathol* **26**, 1198-1206.
- Möller W, Hofer T, Ziesenis A, Karg E, Heyder J (2002). Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol.* **182**, 197-207
- Morrow PE (1988) Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam Appl Toxicol* **10**, 369-84.
- Morrow PE (1992) Dust overloading of the lungs: update and appraisal. *Toxicol Appl Pharmacol.* **113**, 1-12.
- Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B (2001). Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 1665-1668.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**, 411-414.
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Nemery B (2004). Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett* **149**, 243-253.
- Nemmar A, Hamoir J, Nemery B, Gustin P (2005). Evaluation of particle translocation across the alveolo-capillary barrier in isolated perfused rabbit lung model. *Toxicology* **208**, 105-113.
- Oberdörster G (1988). Lung clearance of inhaled insoluble and soluble particles. *J Aerosol Med* **1**, 289-330.
- Oberdörster G (1993). Lung dosimetry : pulmonary clearance of inhaled particles. *Aerosol Sci Technol* **18**, 279-289.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193-199.
- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE (1994). Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* **102 (Suppl. 5)**, 173-179.

- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* **16**, 437-445.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* **65**, 1531-1543.
- Ogawara K, Higaki K, Kimura T (2002). Major determinants in hepatic disposition of polystyrene nanospheres: implication for rational design of particulate drug carriers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **19**, 277-306.
- Ogawara K, Yoshida M, Furumoto K, Takakura Y, Hashida M, Higaki K, Kimura T (1999). Uptake by hepatocytes and biliary excretion of intravenously administered polystyrene microspheres in rats. *J Drug Target* **7**, 213-221.
- Osaki F, Kanamori T, Sando S, Sera T, Aoyama Y (2004). A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region. *J Am Chem Soc* **126**, 6520-6521.
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* **377**, 159-169.
- Renwick LC, Donaldson K, Clouter A (2001). Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **172**, 119-127.
- Schlessinger RB (1995). Deposition and clearance of inhaled particles. In Concepts in inhalation toxicology (R. McClellan, and R. F. Henderson, Eds.), pp. 191-224. Taylor & Francis, Bristol, PA.
- Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G, Kreyling WG (2004). Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol* **16**, 453-459.
- Shim J, Seok KH, Park WSS, Han SH, Kim J, Chang IS (2004). Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Rel* **97**, 477-484.
- Simon BH, Ando HY, Gupta PK (1995). Circulation time and body distribution of ¹⁴C-labeled amino-modified polystyrene nanoparticles in mice. *J Pharm.Sci* **84**, 1249-1253.
- Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect* **109** (Suppl. 4), 547-551.
- Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Möller W, Behnke-Semmler M, Jennen L, Walch A, Michalke B, Schramel P, Heyder J, Schulz H (2006). Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* **18**, 733-740.
- Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Falk R, Philipson K, Lundin A, Larsson S, Moller W, Kreyling WG, Svartengren M (2006a). No significant translocation of inhaled 35-nm carbon particles to the circulation in humans. *Inhal Toxicol*. **18**, 741-747.
- Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Seitz J, Falk R, Philipson K, Kreyling WG, Möller W, Sommerer K, Larsson S, Svartengren M (2006b). Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs. *Eur Respir J* **28**, 286-290.

3. Particules ultra-fines et pénétration par la voie cutanée

B. Hervé-Bazin

La population générale est exposée aux PUF par voie environnementale (voir chapitre 2, point 2), notamment les « consommateurs », parce que certaines (par exemple TiO_2 et ZnO) entrent dans la composition de produits cosmétiques (crèmes solaires, mais aussi produits de traitement des pieds, déodorants, antitranspirants, produits pour rasage / épilation, dentifrices, rouges à lèvres, etc.) Des formulations de ce type ont un débouché facilité par le fait que ces particules deviennent invisibles à l'œil nu : ainsi les crèmes solaires correspondantes ne laissent pas de traînées blanchâtres sur la peau, tout en conservant leurs propriétés protectrices (Alexander, 1991). Il existe par ailleurs des expositions professionnelles aux PUF (cf. chapitre 2, point 3).

L'importance d'une possible pénétration percutanée de particules ultra-fines tient à la surface considérable de la peau, à l'ubiquité des PUF dans notre environnement, et enfin à ses conséquences éventuelles (voir chapitres 4 à 6). Or cette pénétration peut sembler improbable, pour des espèces minérales de faible solubilité, au vu des propriétés remarquables de la peau (voir encadré 3.1) ; comme l'écrit Ginestar (2003) : « Les pigments minéraux insolubles en milieu aqueux ou dans les solvants organiques n'ont pas qualité pour un tel passage. »

Les facteurs qui pourraient influencer une éventuelle pénétration cutanée seraient *a priori* les suivants :

- la taille : en effet, les nanoparticules (taille ≤ 100 nm) sont de petite taille à l'échelle cellulaire : un globule rouge fait de l'ordre de $7\text{ }\mu\text{m}$, soit $7\,000$ nm, une bactérie de l'ordre de $1\,000$ nm, un virus de l'ordre de 60 à 100 nm. On peut donc imaginer une pénétration plus ou moins grande dans le réseau lipidique du *stratum corneum* (voir par exemple Bouwstra et coll., 2000 ; Menon et Elias, 1997) ;
- les propriétés de surface de la particule : les particules utilisées dans les formulations cosmétiques sont généralement traitées en surface pour limiter tant la formation de radicaux libres que l'aggrégation, et améliorer la stabilité dans le temps des formulations. Un revêtement hydrophobe pourrait favoriser la pénétration cutanée grâce à une affinité plus marquée pour les lipides du *stratum corneum*. ;
- les « défauts de la cuirasse », c'est-à-dire l'existence de pores, qui constituent une voie de pénétration, ou encore la présence de sueur, laquelle peut modifier la surface des particules (dissolution partielle, formation d'espèces chimiques nouvelles...).

Encadré 3.1

Quelques rappels de la physiologie cutanée

La peau humaine est formée du derme et de l'épiderme (Menon, 2002).

1. L'épiderme, d'épaisseur 100 à 150 μm selon les régions du corps, est constitué à environ 80 % de cellules spécialisées stratifiées, les kératinocytes. On distingue 4 couches (du bas vers le haut) : *stratum basale* (couche basale, une seule épaisseur de cellules), *stratum spinosum* (couche épineuse), *stratum granulosum* (couche granuleuse), et *stratum corneum* (couche cornée). Cette dernière, formée de lamelles serrées, est continuellement renouvelée à partir des cellules de la base ; il faut 4 à 6 semaines pour qu'une cellule basale parvienne à la couche cornée. Les kératinocytes secrètent une sorte de ciment intercellulaire, constitué essentiellement de céramides (un peu plus de 50 %), acides gras libres (environ 27 %) et de cholestérol.

Dans la couche profonde de l'épiderme se trouvent des mélanocytes, qui fabriquent la mélanine, élément essentiel de protection contre les effets nocifs du rayonnement solaire. On y trouve aussi des cellules immunitaires de forme étoilée, les cellules de Langerhans (2-5 % des cellules de l'épiderme), contribuant à la défense contre diverses agressions (bactéries, virus, particules étrangères), et des cellules de Merkel (6-10 % des cellules de l'épiderme), isolées ou groupées, au contact des terminaisons nerveuses, impliquées dans le sens du toucher.

2. Le derme est composé de collagène, d'élastine, et de glucosaminoglycanes, ensemble dit « matrice extracellulaire », formé par des fibroblastes. Il est richement vascularisé par des capillaires, parcouru par un réseau nerveux dense (environ 10 000 fibres nerveuses par mm^2), et inclut les follicules pilosébacés (formation du sébum), les glandes sudoripares, les adipocytes, les mastocytes, et des leucocytes infiltrés.

La peau (coupe générale schématique, figure 3.15) comporte encore des structures annexes, comme les ongles, les poils et cheveux, tous à base de kératine. Les poils sont formés de la racine, implantée dans une petite cavité appelée follicule (située dans le derme), et de la tige. Chaque poil évolue indépendamment des autres, et passe par trois phases (croissance, repos, expulsion). Les poils sont plus abondants partout où la peau est en contact direct avec l'os, sans interposition musculaire.

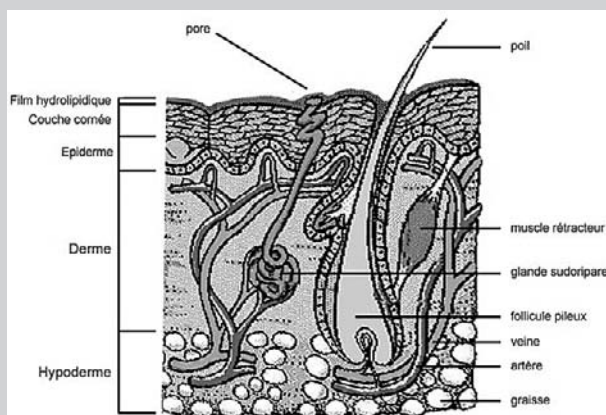


Figure 3.15. Coupe générale schématique de la peau.

La peau exerce donc une fonction de protection générale contre les agressions externes, mécaniques, chimiques, biologiques, ou encore contre le rayonnement solaire. Elle joue aussi un rôle essentiel dans la régulation thermique et les perceptions sensibles (toucher, douleur, température, pression).

La pénétration transcutanée de PUF est donc une éventualité qui mérite examen. Ce chapitre ne traite pas des conséquences potentielles de cette pénétration (irritation, allergies, distribution dans l'organisme, effets systémiques).

Les données relatives à TiO_2 et ZnO , plus nombreuses du fait de leur utilisation dans des formulations cosmétiques ou pharmaceutiques, sont présentées en premier, puis les données complémentaires pour d'autres substances solides de faible solubilité.

3.1. Dioxyde de titane TiO_2

Les données générales sur la taille des particules sont rappelées avant les publications relatives à la pénétration transcutanée ; la question de la formation de radicaux libres et des solutions adoptées pour y remédier est évoquée en dernier lieu.

Des données toxicologiques complémentaires pour TiO_2 sont présentées chapitre 5 point 2.

3.1.1. Tailles des particules

Les spécifications techniques (relatives à l'utilisation du TiO_2 micronisé dans les crèmes solaires) font état de tailles primaires de particules de rutile allant de 14 à 30 nm, suivant le grade, de surfaces spécifiques de 100 à 50 m^2/g , avec des traitements de surface inorganiques de type alumine ou phosphate d'aluminium (sans plus de précision) et organiques (acide stéarique, glycérine, silicone, polyvinylpyrrolidone, pour une surface hydrophobe, comme c'est le plus souvent le cas). Selon Ginestar (2003) et Menzel et coll. (2004), la taille de ces particules dans les produits cosmétiques (crèmes solaires) est de l'ordre de 15 à 60 nm, domaine où la photoactivité est maximale.

3.1.2. Publications revues par dates

Pflücker et coll. (1999) ont cherché à clarifier une controverse relative à la pénétration dermique du TiO_2 en utilisant des cellules à diffusion de Franz (figure 3.16) sur peau de porc excisée. La localisation globale du TiO_2 (taille des particules environ 20 nm ; traité en surface par le triméthylsiloxy-silane) a été effectuée par microscopie électronique à transmission, la répartition horizontale et verticale dans le *stratum corneum* a été étudiée par délaminages successifs de la peau à l'aide d'un ruban adhésif, ainsi que par examens au microscope électronique à balayage couplé à un dispositif d'analyse par rayons X (EDAX). TiO_2 a été exclusivement retrouvé sur la couche la plus externe du *stratum corneum* ; le dépôt montrait aussi bien des agglomérats que de rares particules isolées, de tailles allant de 20 à 50 nm. Après dix délaminages, TiO_2 était retrouvé uniquement

dans les sillons cutanés, montrant que le ruban adhésif n'enlève que les particules les plus externes, sans atteindre celles des sillons plus profonds (voir van der Molen et coll., 1997). TiO_2 n'a été retrouvé que très occasionnellement dans la partie supérieure du follicule pileux, sans trace de pénétration profonde. Les auteurs concluent que le follicule pileux n'est pas une voie de pénétration pertinente pour le TiO_2 micronisé.

Un travail similaire, réalisé par Lademann et coll. (1999), confirme ces conclusions pour ce qui se rapporte au *stratum corneum*. En revanche, des particules ont été identifiées près des orifices sudoripares ; après biopsie, des particules isolées de TiO_2 traité en surface ont été trouvées dans le canal, représentant en quantité moins de 1 % de la dose appliquée. Aucune particule n'a été trouvée dans la peau viable.

Le Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended For Consumers (SCCNFP, 2000) « ne propose aucune condition ou restriction à l'utilisation du TiO_2 dans les produits cosmétiques » ; cet avis semble reposer sur une publication de Bennat et Müller-Goymann (2000), qui n'ont pu montrer une pénétration de la peau viable par du TiO_2 micronisé (taille des particules 20 nm), même dans une formulation destinée à favoriser cette pénétration (encapsulation du TiO_2 dans des liposomes).

Revenant sur leur publication de 1999 (résumée plus haut), Pflücker et coll. (2001) réaffirment que le TiO_2 micronisé ne pénètre ni l'épiderme, ni les couches les plus profondes du *stratum corneum*, ni le derme. Ils ont utilisé trois échantillons différents : le premier, hydrophobe (traité triméthylsiloxy, particules cubiques de taille moyenne 20 nm) ; le deuxième, amphiphile (traité alumine et silice, particules primaires 10-15 nm, formant des agrégats acuminés d'environ 100 nm) ; le troisième, hydrophile (traité alumine et silicium), se présentait sous la forme de particules acuminées de 100 nm. Ils concluent que ni les caractéristiques de surface, ni la taille, ni la forme de la particule ne constituent des facteurs de pénétration.

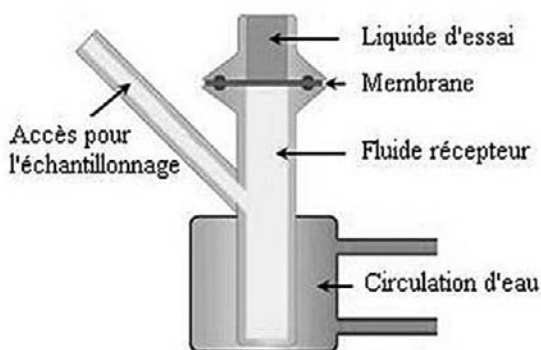


Figure 3.16. Schéma d'une cellule à diffusion de Franz.

Schulz et coll. (2002) ont examiné la distribution sur la peau de ces mêmes échantillons (Pflücker et coll., 2001, ci-dessus) par microscopies optique et électronique à balayage. L'émulsion utilisée, de formule complexe, comprenait 4 % de TiO_2 et était appliquée pendant six heures, sans occlusion, à raison d'environ $160 \mu\text{g}$ par cm^2 . Leurs conclusions sont identiques.

Une thèse de médecine a été consacrée au sujet de la pénétration cutanée de TiO_2 micronisé (Rickmeyer, 2002). L'auteur n'a pas trouvé de différence significative de pénétration cutanée entre deux échantillons, UV-Titan M 160 (taille des particules environ 17 nm ; revêtement acide stéarique 7,1 %, alumine 6,3 % et silice 0,2 %) et Tioveil AQ-N (revêtement silicium, aluminium et polyacrylate de sodium, taille des particules de 10 à 160 nm), malgré leurs revêtements de surface différents. Elle suppose que la présence de PUF de TiO_2 dans certains follicules pileux pourrait être liée aux cycles de croissance/décroissance du poil.

Menzel et coll. (2004) ont étudié la distribution verticale de PUF de TiO_2 (particules lancéolées, de longueur 45 à 150 nm, de largeur 17 à 35 nm) dans la peau de porc, pour quatre formulations de cosmétiques (concentrations de TiO_2 de 4,5 à 40 %). Dans ce bref article, les auteurs estiment avoir prouvé que ces particules pénètrent *via* les espaces intercellulaires à travers le *stratum corneum* et, dans les huit heures après application, dans le *stratum granulosum* sous-jacent. Pour eux, la pénétration *via* les canaux folliculaires n'est pas importante : TiO_2 n'y a pas été détecté. À noter que les peaux ont préalablement été nettoyées (lotion d'un type non précisé), rasées puis désinfectées à l'alcool, ce qui en a probablement modifié les caractéristiques de pénétration (voir par exemple Comfort et coll., 1990 ; Obata et coll., 1993 ; van der Merwe et Riviere, 2005). En sens inverse, dans un travail connu par un bref résumé seulement, Gontier et coll. (2004) ne trouvent, avec des moyens d'investigation modernes et divers types de peaux (souris, porc, humaine) des particules de TiO_2 qu'entre les cornéocytes des couches supérieures du *stratum corneum* ; les conditions de préparation des échantillons ne sont pas précisées.

Gamer et coll. (2006) ont étudié avec une cellule de Franz les pénétrations percutanées (peau de porc) de microparticules de ZnO ou TiO_2 , utilisant la technique d'arrachages de couches successives du *stratum corneum* par bande adhésive. Ils n'ont constaté aucun passage, mais les limitations méthodologiques (bande adhésive, concentrations de Ti proches de la limite de détermination, absence de flexions cutanées, particules de TiO_2 sous forme de bâtonnets plutôt que quasi sphériques) rendent ces travaux peu adaptés au but recherché.

En sens contraire, Kertész et coll. (2005) ont observé, utilisant deux techniques microscopiques, une pénétration de PUF de TiO_2 dans le *stratum corneum* en fonction du temps et, dans deux observations, à la limite du *stratum granulosum*.

3.1.3. Problème de la photoréactivité et son traitement

La photoréactivité du TiO_2 est connue depuis longtemps, et on cherche soit à l'utiliser, comme pour la réalisation de surfaces auto-nettoyantes (voir par exemple Yu et coll., 2003) ou d'autres applications (Blake et coll., 1999), soit à la réduire, comme font les fabricants de peinture ou les formulateurs de crèmes solaires, dans le but de limiter la formation de radicaux libres qui nuisent aux performances du produit ou font craindre des effets nocifs.

En effet, au contact de la peau, les radicaux libres formés peuvent dégrader des molécules naturelles protectrices, ou provoquer des phénomènes de cytotoxicité (Cai et coll., 1992 ; Nakagawa et coll., 1997 ; Wamer et coll., 1997 ; Rahman et coll., 2002), notamment si les particules se trouvent à l'intérieur de cellules (Monteiro-Riviere et coll., 2005). Des atteintes de l'ADN sont induites en présence de différents échantillons de TiO_2 (extraits par lavage aux solvants de produits commerciaux), comme l'ont montré Dunford et coll. (1997) sur cellules humaines *in vitro*.

D'après Serpone et coll. (2001), soumis à irradiation lumineuse, des échantillons de TiO_2 , anatase ou rutile de référence, ou extraits de diverses crèmes solaires, catalysent de façon très variable (différences de 1 à 150 entre échantillons d'origine commerciale, l'anatase pur étant plus de 20 fois plus actif) la dégradation photooxydante du phénol et l'attaque de l'ADN de plasmides ou de fibroblastes humains *in vitro*, et peut-être *in vivo*. Ceci peut poser question quant à la prolongation de l'utilisation du TiO_2 dans les écrans solaires. Ces auteurs ont également étudié la photodégradation du phénol après traitements de surface des TiO_2 et montré qu'elle devient alors quasi imperceptible ; ils n'ont donné aucune indication sur la nature de ces traitements.

Si TiO_2 est reconnu comme l'un des meilleurs semi-conducteurs catalysant la dégradation des polluants organiques, les résultats caractérisant cette propriété sont peu reproductibles, comme on vient de le voir. Elle dépend en effet fortement des impuretés (Shah et coll., 2002), de la taille des particules (Almquist et Biswas, 2002), et aussi des différences morphologiques, de phase cristalline, de surface spécifique, de taille des agrégats et de densité surfacique des groupements hydroxyles (Mills et Le Hunte, 1997). C'est pourquoi beaucoup de publications recourent à un type bien repéré de TiO_2 , le Degussa P25 (rapport anatase/rutile 70/30), non poreux, formant des particules cubiques aux bords arrondis (diamètre moyen en nombre 21 nm, 90 % entre 9 et 38 nm), et d'une surface spécifique de $50 \pm 15 \text{ m}^2/\text{g}$. Ces particules forment des agglomérats complexes de tailles de l'ordre de 0,1 à 1 μm .

Les traitements de surface classiques, par exemple par des aluminates et silicates de sodium, résistent aux opérations nécessaires à l'incorporation des particules dans une formulation (Lademann et coll., 2000). Des traitements par des substances organiques

sont aussi pratiqués (triméthylolpropane, néopentylglycol, tensio-actifs, silicones) pour améliorer la dispersibilité du pigment (notamment dans les peintures), ou limiter la production de radicaux libres (phosphates organiques ; Anonyme, 2004 ; Zavadodski, 1999). Il est en général impossible de savoir précisément quels traitements de surface ont été réalisés pour le TiO_2 entrant dans une formulation déterminée, et par conséquent d'évaluer à quel point les modifications résultantes des propriétés physicochimiques et toxicologiques pourraient être à prendre en compte. La formation de radicaux libres sur des produits commercialisés a été constatée par Brezová et coll. (2005). De plus, des PUF de TiO_2 peuvent induire un stress oxydant à des cellules épithéliales bronchiques même sans photoactivation (Gurr et coll., 2005). L'efficacité et la durabilité de ces traitements visant à limiter la formation de radicaux libres à la surface des particules de TiO_2 en présence (ou non) d'irradiation UV ne doivent donc pas être prises pour définitivement garanties.

3.2. Oxyde de zinc ZnO

3.2.1. Tailles des particules

Des particules ultra-fines de ZnO sont fabriquées dans différentes granulométries, par exemple autour de 20, 35, ou 60 nm (nanophase technologies, 2002). Certaines sociétés proposent des granulométries encore plus fines (par exemple, particules de 2 à 6 nm en suspensions aqueuses), offrant une absorption UV nettement renforcée (APT, 2002). Le ZnO micronisé est utilisé dans les cosmétiques sous forme de particules de 40 à 100 nm selon Ginestar (2003).

3.2.2. Publications revues par dates

Une recherche des publications se rapportant à un éventuel passage transcutané de PUF de ZnO n'a donné que très peu de résultats. Des travaux de Hallmans et Liden (1979) et de l'équipe d'Agren (1990 ; 1991a, b ; 2004), il ressort que, si Zn semble atteindre les couches sous-cutanées après application de ZnO , c'est sans doute sous forme ionique et non pas particulaire. Ces publications ne précisent pas les granulométries des échantillons de ZnO .

Selon le SCCNFP (2003) : « D'après les quantités retrouvées après 72 heures dans le fluide récepteur, la quantité de Zn disponible en systémique peut être considérée comme inférieure à 1 % de la dose appliquée » (essais effectués avec ZnO ou différents composés du Zn ; SCCNFP, 2003).

D'autres parties de ces conclusions (SCCNFP, 2003) méritent d'être citées :

« Une partie considérable des essais et résultats présentés ont été effectués il y a 15 ans ou plus ; ils ne répondent donc pas aux exigences actuelles. Ils donnent néanmoins une connaissance d'ensemble de Zn^{++} et de ses composés, parmi lesquels ZnO . »

« Les spécifications physicochimiques du ZnO mis en œuvre dans la plupart de ces études sont incomplètes, la pureté et les impuretés ne sont pas spécifiées. (...) »

« L'objet principal de cette évaluation porte sur l'évaluation de risque du ZnO micronisé (environ $0,2\ \mu\text{m}$), éventuellement traité en surface, utilisé dans les formulations pour protection solaire. »

« Il a été trouvé que le ZnO micronisé est photoclastogène, peut-être ("*possibly*") photo-aérogène, et photo-réactif avec l'ADN de cellules de mammifère *in vitro*. La pertinence de ces données doit être clarifiée par des essais *in vivo* appropriés. »

« On manque de données fiables relatives à la pénétration percutanée du ZnO micronisé ; le potentiel d'absorption par inhalation n'a pas été considéré. »

En conclusion : « (...) le SCCNFP émet l'avis que plus d'informations sont nécessaires pour permettre une évaluation convenable de la sécurité du ZnO micronisé utilisé comme filtre UV dans les produits cosmétiques. En conséquence, la constitution d'un dossier relatif au ZnO micronisé lui-même est requise, incluant les possibles voies de pénétration percutanée et d'exposition systémique. »

3.2.3. Problème de la photoréactivité et son traitement

TiO_2 procure une excellente protection contre les UVB, mais seulement partielle contre les UVA ; c'est pourquoi ZnO micronisé, qui fournit un meilleur écran contre le rayonnement UVA (Pinnell et coll., 2000 ; APT, 2002), est généralement utilisé en complément, d'autant que, moins réfringent, il améliore la transparence du produit ; il est également bactériostatique, déodorant, et peut favoriser la cicatrisation. Ces caractéristiques peuvent encore être améliorées par dopage (addition de quelques ppm à quelques pour-cent d'aluminium, cuivre ou argent).

Jing et coll. (2002) signalent, à la surface de particules ultra-fines d'oxyde de zinc, la présence d'hydroxyles superficiels et de sites déficients en oxygène, caractéristiques essentielles pour des propriétés catalytiques. Ces propriétés dépendent du mode de préparation et de la taille des particules : l'activité photocatalytique décroît lorsque la taille de la particule augmente (Jing et coll., 2001).

En ce qui concerne le ZnO micronisé (particules de 40 à 100 nm dans les cosmétiques, selon Ginestar, 2003), le SCCNFP (2003) fait état d'effets phototoxiques *in vitro* sur culture de cellules de mammifère et leur ADN ; il recommande que la pertinence de ces données soit clarifiée au moyen d'essais *in vivo* appropriés. La FDA (*Food and Drug*

Administration) a autorisé sans restriction l'utilisation du ZnO dans les crèmes de protection solaire, bien qu'il n'apparaisse pas clairement si elle a considéré les propriétés particulières des PUF (Royal Society, 2004).

Le SCCNFP (2003) écrit : « Le ZnO micronisé ("*microfine*") est virtuellement non-photoréactif » (2.10.2. Photo-reactivity). Le ZnO est cependant un photocatalyseur (Doménech et Peral, 2001 ; Li et Haneda, 2003), et la conclusion des tests de mutagénicité est très nette : « sur cellules de mammifères *in vitro* et sous irradiation UV, le ZnO micronisé a été trouvé clastogène, possiblement aneugène et provoquant des atteintes de l'ADN. » (SCCNFP, 2003 ; 2.10.5, *photomutagenicity, overall conclusions*, page 27). Cette conclusion devrait être revue, selon le CTFA (2006), à la lumière d'une publication de Dufour et coll. (2006) qui semble indiquer que l'augmentation de l'incidence des aberrations chromosomiques (cellules ovariennes de hamster chinois) en présence de particules de ZnO (taille moyenne 100 nm) sous rayonnement UV est en réalité due à une susceptibilité cellulaire accrue par le rayonnement ; ainsi ZnO ne serait pas intrinsèquement photoclastogène.

3.3. Données de pénétration cutanée relatives à d'autres PUF

3.3.1. Particules à base de silice

Wasdo et coll. (2005) ont rapporté en quelques lignes un essai *in vitro* de pénétration de PUF de silice (50 nm) dans la peau humaine ou de souris (emplacements d'origine non spécifiés). Des sections de peau étaient soit laissées au repos, soit fléchies à 45°, 30 fois par minute, pendant 2 heures, puis rincées de l'excès de particules, fixées dans le formol et examinées par spectroscopie de fluorescence. Les particules pénétraient (*stratum corneum* et épiderme) les deux types de peaux pour les deux types de traitement, la pénétration étant plus importante pour les échantillons ayant subi les flexions répétées. Elle était aussi plus importante dans la peau des souris, probablement du fait d'un *stratum corneum* moins épais.

3.3.2. Nanocristaux fluorescents (« *quantum dots* »)

Ryman-Rasmussen et coll. (2006) ont étudié la possibilité de pénétration de la peau par des nanocristaux fluorescents de différentes formes (sphériques [QD565] de 4,6 nm, ellipsoïdes [QD655] 12 nm [grand axe] sur 6 nm [petit axe]) et revêtements de surface (neutre, type polyéthylène glycol [PEG], anionique, avec groupements carboxyliques, ou cationique, type PEG modifié amine). [Les nanocristaux fluorescents (*quantum dots*)

sont des particules minérales (taille 2-10 nm environ) généralement constituées d'un « cœur » (sélénure de cadmium, sulfure ou sélénure de plomb) entouré ou non d'une couche de sulfure de zinc, et recouvertes d'un revêtement organique de nature variable (voir par exemple <http://www.evidenttech.com/>).

Ces auteurs ont utilisé des échantillons de peau de porc, la plus proche de la peau humaine, et la technique de cellules à diffusion, sans imposer de flexions répétées. Ils ont constaté (examens en microscopie confocale) une nette pénétration du revêtement cutané par les nanoparticules sphériques (indépendamment du revêtement de surface) ; la moindre présence des particules en fonction de la profondeur d'examen fait penser à un mécanisme par diffusion passive. La pénétration par les nanoparticules ellipsoïdales était moins marquée (peut-être en raison d'un rayon hydrodynamique plus important) et le revêtement semblait jouer un rôle (les particules anioniques ne pénétrant pas). Les auteurs concluent que la possibilité d'un passage transcutané de nanoparticules ne doit pas être rejetée.

3.3.3. Particules de polymères organiques

Un examen de particules organiques est justifié parce que diverses particules peuvent être qualifiées d'insolubles (PLGA, polystyrène, latex, nylon, polyalkylcyanoacrylates), même si la plupart sont plus ou moins rapidement biodégradables (voir par exemple Panyam et coll., 2003). Ce sont donc de vraies particules solides, pour lesquelles les travaux réalisés peuvent éclairer sur le rôle de certains facteurs régissant la pénétration cutanée, notamment propriétés de surface.

De Jalón et coll. (2001) ont étudié par microscopie électronique à balayage, après application cutanée sur la peau de porc (oreille) et diffusion dans des cellules de Franz, les distributions horizontale et verticale de *microparticules sphériques de PLGA* (copolymère d'acides lactique et glycolique 1:1, insoluble dans l'eau, biodégradable) chargées de rhodamine (tailles de 1 à 10 µm, diamètre moyen en volume 4,6 µm). Ils ont observé leur pénétration à travers le *stratum corneum* jusqu'à l'épiderme. La distribution était la plus abondante sur le *stratum corneum*, les plus grosses particules restant à la surface ; le nombre de particules détectées dans la peau diminuait avec la profondeur d'examen : assez élevé jusqu'à 200 µm (correspondant à l'épiderme), très faible à 400 µm (derme), nul à 500 µm.

Dans une étude relative à la sensibilisation au béryllium par voie cutanée, Tinkle et coll. (2002) ont étudié la pénétration de *particules fines de dextrane* rendues fluorescentes (tailles 0,5 et 1 µm) et trouvé, à l'aide d'un microscope confocal, qu'elles peuvent pénétrer le *stratum corneum* (peau humaine intacte) sous l'effet de flexions répétées (qui correspondraient, par exemple, à des mouvements du poignet). L'application de *suspensions de BeO ou BeSO₄* sur la peau rasée de souris a provoqué une sensibilisation, ce qui

est compatible avec une réponse immunitaire médiée par les cellules dendritiques. Cette même équipe a de fait montré (Tinkle et coll., 2003) que les *particules de dextrane* peuvent occasionnellement parvenir jusqu'au derme (peau humaine intacte). L'hypothèse qu'il en est de même pour des PUF de béryllium rendrait compte du lien observé entre l'incidence persistante de la sensibilisation au béryllium chez les travailleurs malgré un net abaissement de leur exposition par inhalation (voir les réflexions de Deubner et coll., 2001). Ce lien est cohérent avec la présence de cellules de Langerhans présentatrices d'antigènes dans l'épiderme viable, qui ont la capacité de stimuler une réponse immunitaire en présence de concentrations nanomolaires d'antigène (Kohli et Alpar, 2004). Les points marquants de ce travail sont les suivants :

- la pénétration des particules dépend de leur taille (0,5, 1, 2 ou 4 μm) : celles de 2 ou 4 μm ne pénètrent pas ;
- cette pénétration s'accroît en fonction du temps : les particules de 0,5 ou 1 μm pénètrent l'épiderme pour 18 % des échantillons en 15 minutes, pour 40 % en 30 minutes, et pour 56 % en 60 minutes ; elles pénètrent le derme pour 12 % des échantillons en 60 minutes ;
- il n'y a aucune pénétration en l'absence de flexions cutanées.

Que d'autres expérimentateurs, tels Lademann et coll. (1999, 2001) n'aient pas détecté de passage similaire pourrait être dû au fait qu'ils ont recouru à des particules de taille supérieure au μm , taille à laquelle Tinkle et coll. n'observent aucune pénétration réelle. De plus, ils n'ont pas imposé de flexions à la peau, procédure qui devrait être adoptée dans le contexte des PUF (Butz, 2005).

Miyazaki et coll. (2003) ont étudié *in vitro* et *in vivo* le passage de *nanoparticules de poly(cyanoacrylate de n-butyle - PCAB)*, contenant soit de la rhodamine 6G soit de l'indométhacine, en dispersion dans un tampon phosphate (pH 7,4), à travers la peau abdominale de rats Wistar mâles.

Après deux heures d'expérimentation *in vitro*, la peau était démontée de la cellule et congelée dans un milieu à 2 % de méthylcellulose, de manière à permettre des coupes verticales ultérieures au microtome. Ces dernières ont été faites de façon à éviter tout transfert de particules en profondeur, et examinées au microscope confocal à laser.

En régime stationnaire, le flux d'indométhacine (taille des particules $188 \pm 7 \text{ nm}$) atteignait $3,29 \mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$, nettement supérieur à celui résultant de la diffusion simple, montrant que les nanocapsules sont capables de pénétrer la peau du rat en huit heures ; les nanoparticules ont été clairement visualisées dans le *stratum corneum*, l'épiderme et le derme.

In vivo, le passage de l'indométhacine était détecté par dosage plasmatique, et confirmait les observations *in vitro*. Selon les auteurs, les données indiquent que les nanocapsules étaient capables de traverser la peau et d'atteindre la circulation sanguine, ce qu'ils

attribuent tant à leur taille qu'à leurs caractéristiques de surface. Ils suggèrent que le passage transcutané accru de l'indométhacine pourrait être dû à une modification de l'organisation des couches lipidiques en présence des nanocapsules, mais reconnaissent que des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer le mécanisme réel de pénétration.

Alvarez-Roman et coll. (2004) ont, pour leur part, utilisé des nanoparticules (tailles 20 et 200 nm) de *polystyrène modifié par des groupements carboxyle* et la peau de porc (oreille). Ils observent une accumulation préférentielle dans les canaux sudoripares, s'accroissant dans le temps, et favorisée pour les plus petites tailles (voir 3.5.1 ci-après). Ils confirment les observations de Pflücker et coll. (1999), de Lademann et coll. (1999), et de Schulz et coll. (2002), résumées plus haut (présence des particules dans les sillons cutanés, sans pénétration réelle du *stratum corneum*). Il est possible que cette observation négative soit due au caractère potentiellement anionique des particules, facteur réputé défavorable (Ryman-Rasmussen et coll., 2006).

En sens contraire, testant sur de la peau de porc excisée des nanoparticules de latex (50, 100, 200 et 500 nm) chargées positivement, négativement, ou neutres, Kohli et Alpar (2004) observent le passage jusqu'à l'épiderme viable des seules nanoparticules de charges négatives de tailles 50 et 500 nm. Ces auteurs ne proposent pas d'explication convaincante à leurs résultats.

3.4. Aperçu synthétique des publications

Les tableaux 3.VII et 3.VIII, ci-après, résument les données, en distinguant entre particules minérales (tableau 3.VII) et organiques (tableau 3.VIII).

Caractéristiques des particules	Modalités de l'expérimentation	Résultats et commentaires des auteurs (extraits)	Références
TiO ₂ micronisé (taille non précisée)	Application cutanée de crèmes solaires 2 à 6 semaines. Analyse ICP de Ti après excision et délaminages successifs (plâtre élastique + colle). Témoins : peaux de cadavres.	Concentrations de Ti plus élevées pour les sujets traités, mais très faibles. Sites cutanés examinés variables.	Tan et coll. (1996)
TiO ₂ micronisé, taille env. 20 nm, traité triméthyl-octylsilane en émulsion à 4 %	Peau dorsale de truie, cellules de Franz. Délaminages successifs par ruban, examens par microscopie électronique à balayage couplé EDAX.	TiO ₂ seulement au niveau du SC, dans les sillons, et occasionnellement dans la partie supérieure de follicules pileux.	Pflücker et coll. (1999)

Tableau 3.VII. Pénétration cutanée de particules minérales.

SC = *stratum corneum*.

TiO ₂ micronisé traité alumine et acide stéarique, taille env. 17 nm, surf. spécif. env. 70 m ² /g	Application de 2 mg/cm ² d'une émulsion sur un avant-bras. Spectroscopie UV/vis. et fluorescence X après 15 dé laminages successifs par ruban.	TiO ₂ reste en surface du SC, pénètre parfois dans les follicules pileux (< 1 % de la dose). Rien au niveau de la peau viable.	Lademann et coll. (1999)
TiO ₂ micronisé, taille 20 nm	Application sur peau humaine, <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> , d'une émulsion eau-huile (peu stable).	Aucune pénétration de la peau viable ; l'encapsulation dans des liposomes améliore la profondeur atteinte.	Bennat et Müller-Goymann (2000)
TiO ₂ micronisé : hydrophobe (taille 20 nm), amphiphile (taille 10-15 nm), ou hydrophile (longueur 100 nm)	Application d'une émulsion eau-huile à 4 % de TiO ₂ sur avant-bras humain (160 µg TiO ₂ par cm ²) pendant 6 heures, sans occlusion. Examen par microscopies optique et électronique à balayage.	Aucune pénétration de l'épiderme, quel que soit le traitement de surface, la taille ou la forme de la particule. Tendance à la formation d'agglomérats.	Pflücker et coll. (2001)
Mêmes échantillons que pour Pflücker et coll. (2001)	Émulsion à 4 % pendant 6 heures, 160 µg/cm ² , sans occlusion. Examens par microscopies optique et électronique à balayage.	Mêmes conclusions que Pflücker et coll. (2001).	Schulz et coll. (2002)
TiO ₂ ; deux échantillons 17 nm et 10-160 nm, traités en surface	Émulsions à env. 5 % de TiO ₂	Env. 90 % du TiO ₂ restent à la surface, et env. 1 % dans les follicules pileux. Rien dans la peau viable. Pas de différence visible entre les 2 échantillons.	Rickmeyer (2002)
TiO ₂ longueur 45-150 nm, largeur 17-35 nm	4 formulations de type cosmétique (4,5 à 40 % de TiO ₂) sur peau de porc lavée, rasée et désinfectée à l'alcool. Analyses avec des techniques modernes (PIXE, RBS, STIM, LIPSION).	Les particules pénètrent le SC jusqu'à la couche sous-jacente (<i>stratum granulosum</i>), mais pas au-delà. Aucune détection dans les canaux folliculaires.	Menzel et coll. (2004)
Nanocristaux fluorescents sphériques (6 nm) ou ellipsoïdaux (6 × 12 nm) avec différents revêtements de surface	Sur peau de porc en cellule à diffusion, sans flexions. Examen par microscopie laser confocale.	Pénétration fonction de la forme (les sphériques pénètrent rapidement) et du revêtement (les ellipsoïdaux anioniques ne pénètrent pas).	Ryman-Rasmussen et coll. (2006)

Tableau 3.VII. (suite) Pénétration cutanée de particules minérales.

SC = *stratum corneum*.

Caractéristiques des particules	Modalités de l'expérimentation	Résultats et commentaires des auteurs	Références
Microsphères PLGA, chargées d'adapalène (0,1 % dans un gel aqueux), de 1, 5 ou 20 µm	Peau ventrale du rat <i>hairless</i> femelle et peau humaine (<i>in vitro</i>), peau de souris et d'avant-bras (<i>in vivo</i>).	Pénétration fonction du diamètre, présence dans les follicules pileux, notamment pour la taille 5 µm.	Rolland et coll. (1993)
Microsphères (5 µm) poreuses de nylon-12 contenant de la rhodamine 6G	Rats <i>hairless</i> mâles. Rasage et épilation à la cire, application (massage 1 minute), nettoyage avec le véhicule. Comparaison des aires traitées et non traitées.	Pénétration dans les follicules pileux, mais pas dans le SC. Forte influence du véhicule ($p < 0,0001$).	Sumian et coll. (1999)
Particules sphériques de PLGA chargées de rhodamine (taille 1-10 nm, médiane en volume 4,6 µm)	Application de 0,3 mg (formulation non précisée) sur peau de porc (oreille) et cellule à diffusion de Franz. Examen par microscopie de fluorescence après lavage à l'eau.	Coupes verticales (3 µm) ou horizontales (10 µm). Pénétration des particules décroissant jusqu'à l'épiderme. Rien à 500 µm.	De Jalón et coll. (2001)
Particules de 0,5, 1, 2 ou 4 µm de dextrane modifié par l'isothio-cyanate de fluorescéine	Peau humaine (dos ou cuisse) ou de souris. Examens au microscope confocal et électronique à balayage.	Pénétration jusqu'au derme (0,5 ou 1 µm), uniquement si la peau est soumise à des flexions répétées.	Tinkle et coll. (2002, 2003)
Nanoparticules (taille 188 nm) de PCAB contenant indométhacine ou rhodamine 6G	Application d'une dispersion en tampon phosphate sur peau abdominale de rats Wistar mâles.	<i>In vitro</i> : des particules ont été visualisées jusqu'au derme. <i>In vivo</i> : passage dans la circulation sanguine.	Miyazaki et coll. (2003)
Nanoparticules de polystyrène modifié carboxylate (tailles 20 et 200 nm)	Suspension de nanosphères. Application <i>in vitro</i> de 0,5 à 2 heures sur peau de porc. Examens au microscope confocal à laser à 2 longueurs d'onde.	Accumulation préférentielle dans les canaux sudoripares en fonction du temps et de la taille. Pas de pénétration réelle du SC.	Alvarez-Roman et coll. (2004)
Microsphères (5 µm) poreuses de nylon contenant du bleu de méthylène, dispersées dans du silicone	Rats <i>hairless</i> mâles. Rasage, épilation à la cire, lavage à l'éthanol, application. Examens par microscopie de fluorescence après nettoyage à l'éthanol 0, 2 ou 6 h après.	Pénétration uniquement dans les follicules pileux, en fonction du temps (max. après env. 20 heures).	Mordon et coll., 2003 (voir Sumian et coll., 1999)

Tableau 3.VIII. Pénétration cutanée de particules de polymères organiques (liposomes exclus).

SC = *stratum corneum*. PCAB = poly(cyanoacrylate de *n*-butyle).

PLGA = copolymère d'acides lactique et glycolique.

Nanoparticules fluorescentes de latex (50, 100, 200 ou 500 nm) neutres ou chargées.	Peau de porc excisée et cellule de Franz. Perméation évaluée par mesure de la fluorescence dans le fluide récepteur.	Seules les particules de 50 et 500 nm de charges négatives ont atteint la peau viable.	Kohli et Alpar, 2004
Microsphères de polystyrène de 0,75 à 6 µm	Peau humaine (homme ou femme) <i>in vitro</i> , avec ou sans délaminage par colle cyanoacrylate. Examens par microscopie (optique, fluorescence, confocale à laser).	Taille optimale pour la pénétration dans les follicules pileux, 1,5 µm. Aucune autre voie de pénétration observée (du fait de la rigidité des microsphères ?).	Toll et coll. (2004)

Tableau 3.VIII. (suite) Pénétration cutanée de particules de polymères organiques (liposomes exclus).

SC = *stratum corneum*. PCAB = poly(cyanoacrylate de *n*-butyle).

PLGA = copolymère d'acides lactique et glycolique.

3.5. Discussion

3.5.1. Influence de la taille de la particule

Rolland et coll. (1993) ont montré, *in vitro* (cellules à diffusion, peau ventrale du rat *hairless* femelle, peau humaine d'origine non précisée) comme *in vivo* (peau de souris rhino et peau d'avant-bras de volontaires humains), que la pénétration percutanée de microsphères de PLGA chargées d'adapalène (comédolytique) est fonction de leur diamètre. Les auteurs s'intéressent plus particulièrement aux particules de 5 µm de diamètre, qui vont avec une bonne spécificité dans les conduits folliculaires et ne passent pas le *stratum corneum*. Les particules de 20 µm restaient à la surface de la peau ; celles de 1 µm se répartissaient de façon homogène à la surface et, écrivent les auteurs sans autre précision, « pénétraient principalement par voie transépidermale, la surface des ouvertures folliculaires ne représentant que 0,1 % de la surface totale ».

Plus récemment, et en utilisant des particules réellement ultra-fines, Verma et coll. (2003) ont montré, sur échantillons de peaux humaines, que des liposomes pénètrent d'autant mieux que leur taille est petite (71 nm, pénétration maximale ; 120 nm : pénétration supérieure à celle des liposomes plus gros ; taille maximale permettant une pénétration ≤ 300 nm). Cependant, les limites fixées à cette présentation sont ici passées, les liposomes étant des sphères synthétiques plus ou moins déformables de phospholipides, capables de se mêler aux lipides intercellulaires et d'en désorganiser le réseau (voir par

exemple : de Jager et coll., 2004) ; cette plasticité joue un rôle déterminant dans leur pénétration (Honeywell-Nguyen et coll., 2004).

Toll et coll. (2004) ont étudié l'influence de la taille de *microsphères de polystyrène* (de 0,75 à 6 µm) dans la pénétration cutanée, avec ou sans délaminage de la peau par cyanoacrylate. La taille optimale pour la pénétration dans les follicules pileux était de 1,5 µm ; la pénétration touchait moins de 27 % des follicules et atteignait 1 000 µm (sans délaminage), ou 55 % et plus de 2 300 µm (avec délaminage). La vitesse de pénétration dépend plus de la densité pileuse que du diamètre des follicules.

Shim et coll. (2004) ont montré, *in vitro* et *in vivo*, une pénétration cutanée accrue de nanoparticules de copolymère poly-ε-caprolactame (bloc) poly(éthylèneglycol) : les particules de 40 nm pénétraient 1,5 à 1,7 fois plus que celles de 130 nm. Ils ont montré la présence du polymère dans le fluide récepteur, ce qui signifie que des nanoparticules ont traversé l'échantillon cutané (peau abdominale de cobaye Hartley albinos à pilosité normale). À noter toutefois que les véhicules contenaient de 2 à 30 % d'éthanol. Ils font l'hypothèse que la surface externe de polyéthylène glycol (hydrophile) favorise la distribution vers les follicules pileux, puis la pénétration.

3.5.2. Influence de la surface de la particule

Les tableaux précédents permettent de constater que les particules organiques sont pratiquement toutes capables de pénétrer plus profondément dans la peau que les minérales.

Le premier paramètre explicatif qui vient à l'esprit est celui de la surface, puisqu'il n'y a rien de commun entre particules organiques et minérales de ce point de vue. Le principal intérêt des particules organiques se trouve dans les variations pratiquement infinies que l'on peut donner à ce paramètre, tant du point de vue de la composition qualitative (voir Ravi Kumar, 2000) que de celui des variations en pourcentages des constituants (voir Gabor et coll., 1999 ; Sahoo et coll., 2002 ; Huang et coll., 2004). La composition de la surface intervient dans les caractéristiques de pénétration (par exemple de Campos et coll., 2003, à travers la cornée ; Vila et coll., 2004, à travers la muqueuse nasale ; voir point 4 dans ce chapitre), mais semble avoir été étudiée plutôt pour définir un organe de destination ou prolonger le temps de demi-vie (Royal society, 2004 ; Illum et Davis, 1987) ; il est vrai qu'il semble de peu d'intérêt de favoriser la pénétration cutanée de particules minérales. Il se pourrait toutefois que des groupements superficiels conférant un caractère anionique constituent un facteur défavorable à la pénétration (voir Alvarez-Roman et coll., 2004 ; Ryman-Rasmussen et coll., 2006).

Un traitement de surface peut également, comme on l'a vu pour TiO₂ et ZnO, réduire ou empêcher la formation de radicaux libres. Encore faudrait-il s'assurer que ce revêtement reste efficace (ce qui n'est pas toujours le cas, selon Brezová et coll., 2005) et reste intact en milieu biologique.

3.5.3. Rôle de l'élasticité de la particule

Un deuxième examen des tableaux précédents montre qu'un autre paramètre exerce un rôle important pour la profondeur de pénétration : celui de la plasticité (ou élasticité), phénomène étranger à une particule minérale de faible solubilité, indéformable. Des particules organiques rigides ne semblent pas pénétrer facilement (voir la remarque de Toll et coll., 2004, pour des microsphères de polystyrène, tableau 3.VIII), et la plasticité est un paramètre important de la pénétration (Honeywell-Nguyen et coll., 2002, 2003, 2004). C'est d'ailleurs ce qui explique l'énorme développement de la recherche en matière de (nano)liposomes, parfois classés en ultradéformables (« transferosomes »), déformables, non rigides, et rigides (Barry, 2001, 2002 ; Müller et coll., 2002).

Il ne s'agit probablement pas d'un effet purement mécanique. Quelques auteurs ont mis en évidence, dans certains cas, des modifications de l'ultrastructure du *stratum corneum*, avec désorganisation des bicouches lipidiques intercellulaires (van der Bergh et coll., 1999). Par ailleurs, aucune donnée relative à l'élasticité de nanoparticules organiques n'a pu être trouvée, même pour le PLGA, le plus utilisé.

3.5.4. « Défauts de la cuirasse »

| Follicules pileux

Bien que son importance potentielle ait été repérée depuis près de 20 ans (Kao et coll., 1988), la voie de pénétration folliculaire a souvent été sous-estimée en raison d'un *a priori* fondé sur la faible proportion de surface cutanée qu'elle occupe (environ 0,1 %). Schaefer et Lademann (2001) observent que :

- une peau qui s'est reconstituée après brûlure au second degré ne comporte pas de follicules pileux, et se révèle largement moins perméable que la peau voisine non lésée ;
- la perméabilité de la peau d'un rat de moins de cinq jours, qui ne comporte encore pas de follicules pileux, est nettement moins grande que celle de rats plus âgés.

Otberg et coll. (2004) ont par ailleurs souligné les variations des paramètres caractérisant les follicules pileux en différents sites (front, dos, thorax, bras, avant-bras, cuisse, mollet). La plus forte densité folliculaire a été trouvée au front, tandis que les canaux folliculaires étaient les plus larges au mollet. Ainsi, chaque région du corps présente des caractéristiques distinctes, ce qui devrait être pris en compte dans l'interprétation des données de pénétration cutanée.

Des travaux comme ceux de Lieb et coll. (1997), Li et Hoffman (1997), Sumian et coll. (1999) ou encore Mordon et coll. (2003) ont montré, dans diverses conditions expérimentales, que la distribution de particules vers les follicules pileux est fonction de leur

taille, de leur charge, de leur lipophilicité, de la formulation du véhicule et du prétraitement de la peau (influence notamment de l'éthanol). La pénétration cutanée empruntant la voie folliculaire peut ainsi être accrue d'un facteur de l'ordre de 10.

| La sueur et son rôle potentiel

Une difficulté dans l'interprétation des phénomènes provient de la notion de solubilité (Borm et coll., 2006 ; voir chapitre 1, point 5.1). D'une part, l'insolubilité absolue (dans l'eau) n'est pas démontrable, car la solubilité peut être inférieure au seuil de détection de la méthode d'analyse ; d'autre part, elle dépend de nombreux paramètres expérimentaux pas toujours maîtrisés, comme température, granulométrie, agitation, pH, pureté de l'eau ou durée de contact (Ashley, 2001) ; enfin, elle n'est pas identifiable à la non-solubilité dans les milieux biologiques, tels la sueur ou le fluide pulmonaire, qui ne peuvent être assimilés à l'*aqua simplex* (Oberdörster, 1988 ; Kreyling, 1992 ; Vitarella et coll., 2000). Ainsi Oberdörster (2000) a-t-il considéré ne pas pouvoir affirmer le passage de nanoparticules de platine (diamètre médian en nombre 13 nm) du poumon au foie, dans lequel l'analyse chimique avait détecté cet élément, une petite partie ayant pu avoir été dissoute au niveau du poumon. On peut de même concevoir qu'une PUF de TiO_2 se trouve très légèrement dissoute dans certains milieux biologiques et présente par suite des propriétés toxicologiques inattendues ; c'est ce qui semble se produire pour certaines PUF réputées insolubles ou très peu solubles telles que le pentoxyde de vanadium (Toya et coll., 2001), l'oxyde de cadmium (Oberdörster, 1988), ou encore le chromate de plomb (Wise et coll., 1993, 1994).

Tinkle et coll. (2003), on l'a vu plus haut, ont montré la pénétration jusqu'au derme de nanoparticules de dextrane marqué ; on pourrait craindre qu'elle ne soit due qu'à une plasticité suffisante de ces particules, valorisée d'une façon unique par des flexions répétées de la peau. Leur travail est complété par des tests positifs de sensibilisation par voie cutanée avec BeSO_4 (soluble) ou BeO (« insoluble » ; Tinkle [2004b] indique que « BeO a une demi-vie de dissolution de plusieurs centaines de jours », sans préciser ni granulométrie, ni dans quel milieu...), lesquels semblent bien démontrer une pénétration cutanée, du moins jusqu'aux cellules de Langerhans. Mais il reste possible que BeO donne naissance, sous l'action de la sueur ou d'autres constituants physiologiques, à des composés solubles qui pourraient être à l'origine de la sensibilisation (voir Finch et coll., 1988 ; Stefaniak et coll., 2005a, b) ; cette question ne semble pas résolue (Stefaniak et coll., 2006). La solubilité de cette espèce chimique peut également dépendre de l'histoire et/ou de l'origine des particules (Finch et coll., 1998 ; Stefaniak et coll., 2006). La démonstration de la pénétration cutanée profonde de PUF de béryllium ne serait complète qu'avec l'observation *in situ* de particules caractérisées de BeO , ce qui n'a pas été fait. Par ailleurs, on pourrait craindre, si faible que soit l'exposition par voie

inhalatoire, un contact à ce niveau de particules contenant du béryllium avec des cellules dendritiques (Gehr et coll., 2006), ce qui suffirait à la sensibilisation.

Un élément en faveur d'une réelle pénétration consiste dans l'observation, par la même chercheuse (Tinkle, 2004a), de l'induction de modifications de protéines structurales et de l'expression génique de cellules MH-S par des particules de polystyrène de 1 µm, que l'on peut considérer comme réellement insolubles en milieu physiologique ; des particules de BeO induisaient des modifications différentes (au niveau des molécules d'adhésion intercellulaire et de gènes correspondant au complexe majeur d'histocompatibilité). Des nanoparticules vraies n'ont pas été testées. Tinkle (2004b) affirme cependant clairement avoir démontré que des particules microniques sont capables de pénétrer le *stratum corneum* et d'atteindre l'épiderme et les cellules de Langerhans, ce qui implique l'approfondissement des études pour des nanoparticules vraies.

Conclusion

Selon Hett et coll. (2004), l'ensemble des études ne permet pas de conclure avec certitude si, oui ou non, certaines des PUF étudiées peuvent pénétrer dans l'organisme par la peau. Pour ces auteurs, les disparités d'appréciation trouvent probablement leur source dans des méthodes d'examen différentes.

Une partie de la difficulté à relire ces travaux provient de ceux qui ont utilisé la technique de délaminages successifs de l'épiderme et retenu les résultats correspondants comme des indications fiables d'une pénétration percutanée, alors qu'une telle interprétation risque d'être erronée et doit être recoupée par des examens moins rudimentaires (van der Molen et coll., 1997). Plusieurs études ont également réalisé des traitements préalables de la peau, tels que lavage avec une solution tensio-active ou des alcools légers, modifiant ainsi les caractéristiques fondamentales du *stratum corneum*.

Une autre difficulté se trouve dans l'utilisation de véhicules variés et de composition pas toujours bien précisée. Or le véhicule peut avoir une profonde influence sur la pénétration cutanée ; ainsi, certaines substances comme des alcools légers, des sulfoxydes, des surfactants non ioniques (polysorbates, alkyl-éthers et esters polyéthoxylés), l'acide oléique additionné de propylène glycol, sont réputées augmenter le flux de pénétration (Williams et Barry, 2004).

Taille

À l'échelle du micron et au-delà, les particules restent globalement à la surface du *stratum corneum* (Lademann et coll., 1999 ; Pflücker et coll., 1999, 2001 ; de Jalón et coll., 2001 ; Schulz et coll., 2002), accédant naturellement, en fonction de leur taille, aux creux des replis cutanés (frottements, plissements de la peau) et aux canaux sudoripares

(environ 0,1 % de la surface). La taille optimale pour entrer dans ces derniers se situerait dans la zone 1 à 5 μm (5 μm pour Rolland et coll., 1993 ; taille optimale 1,5 μm pour Toll et coll., 2004) ; logiquement, la proportion des particules qui y pénètrent est faible (environ 0,5 % selon Lieb et coll., 1997 ; moins de 1 % pour Lademann et coll., 1999 ; indétectable selon Menzel et coll., 2004). Il ne semble pas que les particules puissent, de là, aller plus loin (la diffusion n'a évidemment pas lieu d'être considérée pour des particules solides, sauf dissolution partielle).

Les particules réellement ultra-fines présentent un comportement analogue (Alvarez-Roman et coll., 2004), mais sont capables de pénétrer plus profondément (Tinkle et coll., 2002, 2003 ; Miyazaki et coll., 2003), et d'autant mieux que leur taille est réduite (Tinkle et coll., 2003 ; Verma et coll., 2003 ; Shim et coll., 2004). Elles seraient capables de se glisser plus ou moins dans les espaces intercellulaires, notamment sous l'influence de plissements répétés de la peau. Il manque peu de choses pour considérer comme démontré que des PUF de béryllium peuvent, dans ce contexte, atteindre la couche basale ; une démonstration directe des résultats isolés de Tinkle (avec le béryllium ou d'autres particules minérales dites insolubles) reste cependant nécessaire.

Les travaux de Ryman-Rasmussen et coll. (2006, voir point 3.3.3) avec de vraies nanoparticules de différentes formes et revêtements de surface (nanocristaux fluorescents) semblent toutefois bien montrer que certaines sont susceptibles de pénétrer le stratum corneum.

Élasticité

L'élasticité des particules favorise clairement leur pénétration en profondeur, mais ce paramètre n'intervient pas pour des particules minérales, supposées indéformables.

Propriétés de surface

Les traitements de surface, tels que pratiqués sur les PUF de TiO_2 , ne semblent pas influencer la pénétration (Pflücker et coll., 2001 ; Schulz et coll., 2002 ; Rickmeyer, 2002).

Il est possible que la nature des particules et d'éventuels traitements de surface autres que ceux classiquement appliqués à TiO_2 ou ZnO modulent leurs propriétés de pénétration cutanée, mais il n'y a pas de publications dans ce domaine.

En concluant, il faut rappeler que tous les travaux sont effectués sur des peaux saines en bon état (ni brûlure, ni coupure, ni eczéma ou autre allergie) et généralement préparées selon un protocole défini (rasage, épilation, nettoyage à l'alcool ou par un tensioactif...). C'est certes justifié du point de vue expérimental, mais non représentatif de la réalité des conditions de travail, où les mains, notamment, comportent souvent des égratignures, des microcoupures, sont trop sèches ou très hydratées, parfois au contact de

solvants, ou encore déjà plus ou moins imprégnées de produits variés (crème barrière, poussières déposées sur les surfaces voisines, produits d'entretien ou de nettoyage, etc.). De simples microfissures cutanées, invisibles à l'œil nu, peuvent constituer une porte de pénétration non négligeable pour n'importe quel type de PUF.

Rappelons encore que ces travaux ont été réalisés sur des échantillons différents, peaux soit de rats, de porcs, ou d'autres animaux (*hairless* ou non), parfois humaines, de localisations diverses (dos, ventre, cuisse, mollet, avant-bras, oreille...), *in vitro* (dans des conditions expérimentales elles-mêmes variées, par exemple pour la température, le fluide récepteur ou son agitation, les volumes prélevés, les durées de contact...) ou *in vivo* (avec des véhicules différents, avec occlusion ou non, etc.), et analysés par des techniques variées et parfois critiquables (délaminages par ruban adhésif avec ou sans colle, par exemple). Une telle diversité fait ressortir l'utilité potentielle d'une harmonisation des conditions d'essais, proposée à plusieurs reprises (EPA, 1992 ; Howes et coll., 1996 ; OCDE, 1996), mais qui semble difficile à réaliser ou à imposer, vu le grand nombre de paramètres à vérifier et la diversité des besoins.

Les conclusions tirées de ces travaux sont donc fondées sur des conditions à la fois « idéales » (de laboratoire) et « hétérogènes » (conditions différentes) mais sans doute trompeuses (uniquement peaux intactes et sans défauts), et ce d'autant plus que très peu de travaux expérimentaux ont inclus des essais avec flexions cutanées, bien qu'elles soient inévitables en situation réelle. Or Tinkle et coll. (2003, 2004a) et Wasdo et coll. (2005) ont montré sans ambiguïté qu'elles augmentaient nettement la profondeur de pénétration de particules solides, et que certaines pouvaient parvenir à l'épiderme, voire au derme. Cela semble également le cas pour des nanocristaux fluorescents (Ryman-Rasmussen et coll., 2006). Si la démonstration d'un passage transcutané de nanoparticules reste insuffisamment étayée, et n'est pas estimée concluante en ce qui concerne TiO_2 et ZnO dans les crèmes solaires (CTFA, 2006 ; Australian Government, 2006 ; BfR, 2006), les éléments qui plaident en sa faveur sont suffisants, dans quelques cas et dans certaines conditions, pour considérer qu'un tel passage ne doit pas être considéré comme impossible. Des travaux complémentaires rigoureux et convergents restent indispensables pour conclure de façon plus précise.

Bibliographie

- Agren MS, Mirastschijski U (2004). The release of zinc ions from and cytocompatibility of two zinc oxide dressings. *J Wound Care*. **13(9)** 367-369.
- Agren MS (1991a). Influence of two vehicles for zinc oxide on zinc absorption through intact skin and wounds. *Acta Derm Venereol*. **71(2)** 153-156.
- Agren MS, Chvapil M, Franzen L (1991b). Enhancement of re-epithelialization with topical zinc oxide in porcine partial-thickness wounds. *J Surg Res*. **50(2)** 101-105.

- Agren MS (1990). Percutaneous absorption of zinc from zinc oxide applied topically to intact skin in man. *Dermatologica* **180(1)** 36-39.
- Alexander P (1991). Ultrafine titanium dioxide makes the grade. *Manuf Chem* **62**, 21-23.
- Almquist CB, Biswas P (2002). Role of Synthesis Method and Particle Size of Nanostructured TiO₂ on Its Photoactivity. *J Catal* **212(2)** 145-156.
- Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H (2004). Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release* **99(1)** 53-62.
- Amersham Biosciences (2001). Dextran fractions. Fiche 18-1153-41 AA, 2001-11, 6 pages.
- Anonyme (2004). Stabilization of titanium dioxide in non-aqueous and aqueous coatings, 06/01/2004. http://www.pcimag.com/CDA/ArticleInformation/features/BNP__Features__Item/0,1846,126898,00.html
- APT (Advanced Powder Technology, 2002). Why zinc oxide is superior to titanium dioxide. APT fact sheet n° 2, December 2002. www.apt-powders.com.
- Ashley K (2001). International standard procedure for the extraction of metal compounds having soluble threshold limit values. *Appl Occup Hyg* **16(9)** 850-853.
- Australian Government (2006). Department of Health and Ageing. Therapeutic Goods Administration. A review of the scientific literature on the safety of nanoparticulate titanium dioxide or zinc oxide in sunscreens. Quinze pages, 24 références examinées.
- Barry BW (2001). Is transdermal drug delivery research still important today? *Drug Discov Today* **6(19)** 967-971.
- Barry BW (2002). Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv Drug Deliv Rev* **54** (Suppl. 1) S31-S40.
- Bennat, Müller-Goymann (2000). Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *Internat J Cosmet Sci* **22(4)** 271.
- van den Bergh BA, Bouwstra JA, Junginger HE, Wertz PW (1999). Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability. *J Control Release* **62(3)** 367-379.
- BfR (2006). Bundesinstitut für Risikobewertung (Federal Institute for Risk Assessment) Nanotechnology - Applications, Trends and Risks. <http://www.bfr.bund.de/cms5w/sixcms/detail.php/7734>
- Blake DM, Maness PC, Huang Z, Wolfrum EJ, Huang J (1999). Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells. *Sep Purif Methods* **28(1)** 1-50.
- Borm P, Klaessig FC, Landry TD, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K, Trottier R, Wood S (2006). The Role of Dissolution in Biological Fate and Effects of Nanoscale Particles. *Toxicol Sci* **90(1)** 23-32.
- Bouwstra JA, Dubbelaar FE, Gooris GS, Ponc M (2000). The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm Venereol Suppl* (Stockh) **208**, 23-30.
- Brezová V, Gabčová S, Dvoranová D, Staško A (2005). Reactive oxygen species produced upon photoexcitation of sunscreens containing titanium dioxide (an EPR study). *J Photochem Photobiol B: Biology* **79(2)** 121-134.
- Butz T (2005). Nanoderm. In: Nanotechnology – Proceedings of the Workshop: *Research Needs on Nanoparticles*, held in Brussels, 25-26 January 2005, pages 30-32. Édité par R. Tomellini et C. de Villepin.

- Cai R, Kubota Y, Shuin T, Sakai H, Hashimoto K, Fujishima A (1992). Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO₂ particles. *Cancer Res* **52**(8) 2346-2348.
- Comfort AR, Dinh SM, Otte J, Shevchuk I, Berner B (1990). Enhanced transport in a therapeutic transdermal system. *Biomaterials* **11**(9) 729-733.
- CTFA (2006). Comments of the Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA) regarding the scientific and legal issues associated with nanotechnology in personal care products. 67 pages.
- De Campos AM, Sanchez A, Gref R, Calvo P, Alonso MJ (2003). The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. *Eur J Pharm Sci* **20**(1) 73-81.
- Deubner DC, Lowney YW, Paustenbach DJ, Warmerdam J (2001). Contribution of incidental exposure pathways to total beryllium exposures. *Appl Occup Environ Hyg* **16**(5) 568-578.
- Doménech X, Peral (2001). H₂O₂ Formation from Photocatalytic Processes at the ZnO/Water Interface. 7th FECS Conference. *Environ Sci Pollut Res* **8**(4) 285-287 ; http://www.scientificjournals.com/sj/espr_special/Pdf/ald/3656
- Dufour EK, Kumaravel T, Nohynek GJ, Kirkland D, Toutain H (2006). Clastogenicity, photoclastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: Genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* **607**(2) 215-224.
- Dunford R, Salinaro A, Cai L, Serpone N, Horikoshi S, Hidaka H, Knowland J (1997). Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Letters* **418**(1-2) 87-90.
- EPA (1992). Dermal exposure assessment: principles and applications. EPA/600/8-91/011B, January 1992, Interim Report.
- Finch GL, Mewhinney JA, Eidson AF, Hoover MD, Rothenberg SJ (1988). In Vitro Dissolution Characteristics of Beryllium Oxide and Beryllium Metal Aerosols. *J Aerosol Sci* **19**(3) 333-342.
- Gabor F, Ertl B, Wirth M, Mallinger R (1999). Ketoprofen-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: influence of manufacturing parameters and type of polymer on the release characteristics. *J Microencapsul* **16**(1) 1-12.
- Gamer AO, Leibold E, van Ravenzwaay B (2006). The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicol In Vitro* **20**(3) 301-307.
- Gehr P, Blank F, Rothen-Rutishauser BM (2006). Fate of inhaled particles after interaction with the lung surface. *Paediatr Respir Rev*. **7** (Suppl. 1), S73-S75.
- Ginestar (2003). Pigments as photoprotectants. <http://www.thecosmeticsite.com/formulating/suncare/959671.html>
- Gontier E, Habchi C, Pouthier T, Aguer P, Barberet P, Barbotteau Y, Incerti S, Ynsa MD, Surleve-Bazeille JE, Moretto P (2004). Nuclear Microscopy and Electron Microscopy Studies of Percutaneous Penetration of Nanoparticles in Mammalian Skin. 34th annual european society for dermatological research meeting, 9-11 Sept 2004, Vienna, Austria. Abstract number: 64.
- Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* **213**(1-2) 66-73.

- Hallmans G, Lidén S (1979). Penetration of ^{65}Zn through the skin of rats. *Acta Dermato-Venereologica* **59**(2) 105-112.
- Hett A et collaborateurs (non précisés) (2004). Nanotechnology – Small matter, many unknowns. Swiss Reinsurance Company (Swiss Re), P.O. Box 8022, Zurich. 53 pages.
- Honeywell-Nguyen PL, de Graaff AM, Groenink HW, Bouwstra JA (2002). The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. *Biochim Biophys Acta* **1573**(2) 130-140.
- Honeywell-Nguyen PL, Arenja S, Bouwstra JA (2003). Skin penetration and mechanisms of action in the delivery of the D2-agonist rotigotine from surfactant-based elastic vesicle formulations. *Pharm Res* **20**(10) 1619-1625.
- Honeywell-Nguyen LP, Gooris GS, Bouwstra JA (2004). Quantitative Assessment of the Transport of Elastic and Rigid Vesicle Components and a Model Drug from these Vesicle Formulations into Human Skin In Vivo. *J Invest Dermatol* **123**(5) 902-910.
- Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings J, Hoeck U, Kemper F, Maibach H, Marty JP, Merk H, Parra J, Rekkas D, Rondelli I, Schaefer H, Tauber U, Verbieke N (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. The report and recommendations of ECVAM workshop 13. *Alternat Laborat Anim* (ATLA) **24**, 81-106.
- Huang M, Khor E, Lim LY (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm Res* **21**(2) 344-353.
- Illum L, Davis SS (1987). Targeting of colloidal particles to the bone marrow. *Life Sci* **40**(16) 1553-1560.
- de Jager MW, Gooris GS, Dolbnya IP, Ponc M, Bouwstra JA (2004). Modelling the stratum corneum lipid organisation with synthetic lipid mixtures: the importance of synthetic ceramide composition. *Biochim Biophys Acta* **1664**(2) 132-140.
- de Jalón EG, Blanco-Príeto MJ, Ygartua P, Santoyo S (2001). PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *Internat J Pharm* **226**(1-2) 181-184.
- Jing L, Xu Z, Shang J, Sun XJ, Cai WM, Guo HC (2002). The preparation and characterization of ZnO ultrafine particles. *Mater Sci Engineer A* **332**(1-2) 356-361
- Jing L, Xu Z, Sun X, Shang, Jing S, Weimin C (2001). The surface properties and photocatalytic activities of ZnO ultrafine particles. *Appl Surf Sci* **180**(3-4) 308-314
- Kao J, Hall J, Helman G (1988). In vitro percutaneous absorption in mouse skin: influence of skin appendages. *Toxicol Appl Pharmacol* **94**(1) 93-103.
- Kertész Zs, Szikszai Z, Gontier E, Moretto P, Surlève-Bazeille JE, Kiss B, Juhász I, Hunyadi J, Kiss AZ (2005). Nuclear microprobe study of TiO_2 -penetration in the epidermis of human skin xenografts. *Nuclear Instr Methods Phys Res Section B* **231**(1-4) 280-285.
- Kohli AK, Alpar HO (2004). Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int J Pharm* **275**(1-2) 13-17.
- Kreyling WG (1992). Intracellular particle dissolution in alveolar macrophages. *Environ Health Perspect.* **97**, 121-126.
- Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W (1999). Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **12**(5) 247-256.

- Lademann J, Weigmann H, Schäfer H, Muller G, Sterry W (2000). Investigation of the stability of coated titanium microparticles used in sunscreens. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **13**(5) 258-264.
- Lademann J, Otberg N, Richter H, Weigmann HJ, Lindemann U, Schaefer H, Sterry W (2001). Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14** (Suppl. 1), 17-22.
- Li D, Haneda H (2003). Morphologies of zinc oxide particles and their effects on photocatalysis. *Chemosphere* **51**(2) 129-137.
- Li L, Hoffman RM (1997). Topical liposome delivery of molecules to hair follicles in mice. *J Dermatol Sci.* **14**(2) 101-108.
- Lieb LM, Liimatta AP, Bryan R, Brown BD, Krueger GG (1997). Description of the intrafollicular delivery of large molecular weight molecules to follicles of human scalp skin in vitro. *J Pharm Sci* **86**(9) 1022-1029.
- Menon GK (2002). New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev* **54** (Suppl. 1) S3-S17
- Menon GK, Elias PM (1997). Morphologic basis for a pore-pathway in mammalian stratum corneum. *Skin Pharmacol* **10**(5-6) 235-246.
- Menzel F, Reinert T, Vogt J, Butz T (2004). Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO₂ particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION. *Nucl Instr Meth Phys Res B* **219-220**, 82-86.
- Mills A, Le Hunte S (1997). An overview of semiconductor photocatalysis. *J Photochem Photobiol A: Chemistry* (**108**) 1-35.
- Miyazaki S, Takahashi A, Kubo W, Bachynsky J, Loebenberg R (2003). Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration. *J Pharm Pharm Sci* **6**(2) 238-245.
- van der Merwe D, Riviere JE (2005). Effect of vehicles and sodium lauryl sulphate on xenobiotic permeability and stratum corneum partitioning in porcine skin. *Toxicology* **206**(3) 325-335.
- van der Molen RG, Spies F, van't Noordende JM, Boelsma E, Mommaas AM, Koerten H (1997). Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate from various depths because of furrows in the skin. *Arch Dermatol Res* **289**(9) 514-518.
- Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE (2005). Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett* **155**(3) 377-384.
- Mordon S, Sumian C, Devoisselle JM (2003). Site-specific methylene blue delivery to pilosebaceous structures using highly porous nylon microspheres: an experimental evaluation. *Lasers Surg Med* **33**(2) 119-125.
- Müller RH, Radtke M, Wissing SA (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev* **54** (Suppl. 1) S131-S155.
- Nakagawa Y, Wakuri S, Sakamoto K, Tanaka N (1997). The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat Res* **394**(1-3) 125-132.
- Obata Y, Takayama K, Maitani Y, Machida Y, Nagai T (1993). Effect of ethanol on skin permeation of nonionized and ionized diclofenac. *Internat J Pharm* **89**(3) 191-198

- Oberdörster G (1988). Lung clearance of inhaled insoluble and soluble particles. *J Aer Med* **1**(4) 289-330.
- Oberdörster G (2000). Toxicology of ultrafine particles: *in vivo* studies. *Philos Trans Math Phys Engin Sci* **358**(1775) 2719-2740.
- OCDE (1996). OECD guideline for the testing of chemicals. Proposal for a new guideline. Percutaneous absorption: *in vivo* method. Draft document, June 1996.
- Otberg N, Richter H, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J (2004). Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J Invest Dermatol* **122**(1) 14-19.
- Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, Ma W, Chakravarthi SS, Amidon GL, Levy RJ, Labhasetwar V (2003). Polymer degradation and *in vitro* release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J Control Release* **92**(1-2) 173-187.
- Pflücker F, Hohenberg H, Hölzle E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Diembeck W, Wenck H, Gers-Barlag H (1999). The outermost *stratum corneum* layer is an effective barrier against dermal uptake of topically applied micronized titanium dioxide. *Internat J Cosmet Sci* **21**(6) 399-411.
- Pflücker F, Wendel V, Hohenberg H, Gartner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Gers-Barlag H X (2001). 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* **14** (Suppl. 1) 92-97.
- Pinnell SR, Fairhurst D, Gillies R, Mitchnick MA, Kollias N (2000). Microfine zinc oxide is a superior sunscreen ingredient to microfine titanium dioxide. *Dermatol Surg* **26**(4) 309-314.
- Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss DG, Schiffmann D (2002). Evidence That Ultrafine Titanium Dioxide Induces Micronuclei and Apoptosis in Syrian Hamster Embryo Fibroblasts. *Environ Health Perspect* **110**, 797-800.
- Ravi Kumar MNV (2000). Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Pharmaceut Sci* **3**(2) 234-258.
- Rickmeyer C (2002). Penetrationseigenschaften von beschichtetem mikrofeinem Titandioxid. Datum der Promotion: 10. Juni 2002. <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/rickmeyer-christiane-2002-06-10/HTML/rickmeyer-ch4.html#x4.2>
- Rolland A, Wagner N, Chatelus A, Shroot B, Schaefer H (1993). Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm Res* **10**(12) 1738-1744.
- Royal Society (2004). The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. Nanosciences and nanotechnology. July 2004.
- Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA (2006). Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol Sci* **91**(1) 159-165.
- Sahoo SK, Panyam J, Prabha , Labhasetwar V (2002). Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Rel* **82**(1) 105-114.
- SCCNFP (2000). The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended For Consumers. Opinion concerning Titanium Dioxide, Colipa n° S75, adopted by the SCCNFP during the 14th plenary meeting of 24 October 2000.
- SCCNFP (2003). The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended For Consumers. Opinion concerning Zinc Oxide (Colipa n° S 76). SCCNFP/0649/03, final (24-25 juin 2003). 31 pages, 65 références.

- Schaefer H, Lademann J (2001). The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14** (Suppl. 1) 23-27.
- Schulz J, Hohenberg H, Pflücker P, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Wendel V, Gers-Barlag H, Wittern KP (2002). Distribution of sunscreens on skin. *Adv Drug Deliv Rev* **54** (Suppl. 1) S157-S163.
- Serpone N, Salinaro A, Emeline A (2001). Deleterious effects of sunscreen titanium dioxide nanoparticles on DNA: efforts to limit DNA damage by particle surface modification. *Proceedings of SPIE*, **4** **258**, 86-98.
- Shah SI, Li W, Huang CP, Jung O, Ni C (2002). Study of Nd^{3+} , Pd^{2+} , Pt^{4+} , and Fe^{3+} dopant effect on photoreactivity of TiO_2 nanoparticles. *Proceed Nat Acad Sci* **99** (Suppl. 2) 6482-6486.
- Shim J, Seok Kang H, Park WS, Han SH, Kim J, Chang IS (2004). Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Release* **97**(3) 477-484.
- Stefaniak AB, Day GA, Hoover MD, Breyse PN, Scripsick RC (2006). Differences in dissolution behavior in a phagolysosomal simulant fluid for single-constituent and multi-constituent materials associated with beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *Toxicol In Vitro* **20**(1) 82-95.
- Stefaniak AB, Day GA, Hoover MD, Breyse PN, Scripsick RC (2005a). Differences in dissolution behavior in a phagolysosomal simulant fluid for single-constituent and multi-constituent materials associated with beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *Toxicol In Vitro* 2005 Jul 29; [Epub ahead of print]
- Stefaniak AB, Guilmette RA, Day GA, Hoover MD, Breyse PN, Scripsick RC (2005b). Characterization of phagolysosomal simulant fluid for study of beryllium aerosol particle dissolution. *Toxicol In Vitro* **19**(1) 123-134.
- Sumian CC, Pitre FB, Gauthier BE, Bouclier M, Mordon SR (1999). A new method to improve penetration depth of dyes into the follicular duct: potential application for laser hair removal. *J Am Acad Dermatol* **41**(2 Pt 1) 172-175.
- Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ (1996). A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *Australas J Dermatol* **37**(4) 185-187.
- Tinkle S, Antonini J, Roberts J, Salmen R, Depree K, Flint M (2002). Cutaneous Application of Beryllium Salts and Oxide Particles Produces Beryllium-Specific Peripheral Sensitization in the C3H/HeOuJ Mice. Beryllium Research Symposium: Basic Mechanisms and Human Health, June 25-26.
- Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Roberts JR, Salmen R, DePree K, Adkins EJ (2003). Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect* **111**(9) 1202-1208.
- Tinkle SS (2004a). Skin exposure to particles: penetration is dependent on particle size. *The Toxicologist summary n° 1852* (p. 381).
- Tinkle SS (2004b). Dermal penetration of nanoparticles. Nanosymposium Report Buxton, pp. 47-52.
- Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi (2004). Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol* **123**(1) 168-176.
- Toya T, Fukuda K, Takaya M, Arito H (2001). Lung lesions induced by intratracheal instillation of vanadium pentoxide powder in rats. *Ind Health* **39**(1) 8-15.

- Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A (2003). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int J Pharm* **258**(1-2) 141-151.
- Vila A, Sanchez A, Evora C, Soriano I, Vila Jato JL, Alonso MJ (2004). PEG-PLA nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *J Aerosol Med* **17**(2) 174-185.
- Vitarella D, Moss O, Dorman DC (2000). Pulmonary clearance of manganese phosphate, manganese sulfate, and manganese tetraoxide by CD rats following intratracheal instillation. *Inhal Toxicol* **12**(10) 941-957.
- Wamer WG, Yin JJ, Wei RR (1997). Oxidative Damage to Nucleic Acids Photosensitized by Titanium Dioxide. *Free Radical Biol Med* **23**(6) 851-858.
- Wasdo SC, Roberts SM, Santra S, Munson J, Song Y (2005). Imaging the penetration of RUBPY-doped silica nanoparticles into human and mouse skin with fluorescent microscopy. *Toxicologist*, résumé n° 2186 (page 448).
- Williams AC, Barry BW (2004). Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* **56**(5) 603-618.
- Wise JP, Orenstein JM, Patierno SR (1993). Inhibition of lead chromate clastogenesis by ascorbate: relationship to particle dissolution and uptake. *Carcinogenesis* **14**(3) 429-434.
- Wise JP Sr, Stearns DM, Wetterhahn KE, Patierno SR (1994). Cell-enhanced dissolution of carcinogenic lead chromate particles: the role of individual dissolution products in clastogenesis. *Carcinogenesis* **15**(10) 2249-2254.
- Yu JC, Ho W, Lin J, Yip H, Wong PK (2003). Photocatalytic activity, antibacterial effect, and photoinduced hydrophilicity of TiO₂ films coated on a stainless steel substrate. *Environ Sci Technol* **37**(10) 2296-2301.
- Zavadodski W (1999). Effects of coatings on reactivity of inorganic sunscreen agents to light. Crisp Data Base, National Institute of Health. CRISP/1999/RR11602-040084.

Quelques sites Internet à toutes fins utiles

- http://webzine.cstb.fr/webzine/preview.asp?main=2&id_une=71
- <http://www.alkermes.com/polymer/products.html>
- <http://www.azom.com/>
- <http://www.azonano.com/>
- <http://www.bmlweb.org/peau.html#struture>
- <http://www.cegep-rimouski.qc.ca/dep/biologie/humain/peau/peau1.html>
- <http://www.degussa.com>
- <http://www.koboproductsinc.com>
- <http://www.koboproductsinc.com/treatments.html>
- http://www.loreal.com/_en/_ww/loreal-skin-science/organe_revele/
- <http://www.nanophase.com>
- http://www.socnb.com/report/pproduct_e/zop_e.pdf
- <http://www.titaniumart.com/photocatalysis-ti02.html>

4. Pénétration au cerveau par la voie nasale

B. Hervé-Bazin

Introduction – Le passage d'espèces chimiques vers le cerveau

Le passage d'espèces chimiques vers le cerveau peut se produire soit *via* les nerfs afférents à la muqueuse nasale, notamment le nerf olfactif, soit *via* le sang, à travers la barrière hémato-encéphalique. Dans le premier cas, cette dernière est court-circuitée : les neurones olfactifs sont directement au contact des polluants externes dans la muqueuse olfactive, et reliés par leur axone au bulbe olfactif (figure 3.18), ce qui fait d'eux une porte d'entrée privilégiée.

Il a été montré au chapitre 3 (point 1) que des PUF se déposent en proportion non négligeable (surtout si l'on raisonne en nombre) au niveau des fosses nasales. La question d'un risque de passage dans l'organisme à partir de ce point de dépôt, comme cela se produit à partir de PUF déposées dans le poumon, est donc légitime (voir Oberdörster et coll., 2004).

Une espèce chimique soluble a toujours la possibilité de passer des fosses nasales au cerveau par simple diffusion le long du nerf olfactif. La question ici posée est celle de l'accès au cerveau d'espèces particulières non totalement dissoutes. Cette question apparemment simple est en réalité difficile dans le cas des PUF, parce que la solubilité dépend, entre autres facteurs, de la granulométrie (la vitesse de dissolution est d'autant plus grande que la surface offerte est grande, donc que la granulométrie est faible) : des PUF d'une espèce réputée très peu soluble pourraient être dissoutes en fait relativement rapidement. De plus, des espèces chimiques peu solubles dans l'eau peuvent se révéler nettement plus solubles en milieu biologique (Oberdörster, 1992). Des traitements ou revêtements de surface peuvent également modifier le comportement de la particule. Enfin, en deçà d'une certaine taille, il devient difficile de préciser si l'entité suivie est solubilisée ou encore particulière (voir chapitre 1, point 1). Borm et coll. (2006) ont présenté un aperçu plus complet des difficultés de cette question (voir chapitre 1, point 5.1).

Cette problématique de l'accès d'espèces chimiques au cerveau étant relativement récente dans le cadre des risques professionnels, il a semblé utile de l'aborder de façon large pour mieux en montrer la complexité et les possibles implications. Le cas du manganèse (Mn) a été sans doute le plus étudié (Tjälve et Henriksson, 1999), en raison de ses effets neurotoxiques ; nous empruntons à Yokel et Crossgrove (2004) une présentation des acquis dans ce domaine. Toutefois cette présentation est fortement résumée,

la plupart des études ayant été effectuées avec des espèces chimiques solubles du manganèse.

Note. Ne sont retenus de ce travail que les passages les plus significatifs en y conservant, à titre indicatif, les citations bibliographiques, mais sans procéder à un nouvel examen de ces dernières, et sans les reprendre dans la bibliographie. Pour faciliter la compréhension des termes techniques, un encadré (encadré 3.2) est proposé pour rappeler, de façon nécessairement brève et incomplète, quelques données physiologiques relatives aux structures cérébrales principalement impliquées.

Nous résumons ensuite les publications (à partir de l'année 2000) ciblées sur le passage au cerveau à partir des fosses nasales.

Encadré 3.2 **Quelques rappels de physiologie**

L'une des façons de décrire la structure cérébrale consiste à distinguer, très schématiquement, trois « étages » : l'étage « supérieur », siège de la conscience et de la pensée (néocortex, thalamus), l'étage « moyen », ou système limbique (ou paléocortex, ou rhinencéphale), siège de l'affectivité, de la mémoire et de l'apprentissage (hippocampe et son cortex) ; l'étage « ancien », ou « cerveau reptilien », siège de la régulation thermique, des comportements alimentaires et sexuels. Toutes ces structures sont reliées entre elles de façon très complexe et avec des interactions multiples.

• Le système olfactif

Les structures liées directement ou indirectement à l'olfaction constituent un ensemble fonctionnel lié au système limbique, lequel fonctionne en étroite relation avec le néocortex orbitofrontal, auquel il est relié bidirectionnellement, et avec l'hypothalamus et la formation réticulée.

L'air inhalé parvient au contact de la muqueuse olfactive, ou « tache jaune », qui tapisse la partie supérieure des fosses nasales sur quelques cm² chez l'être humain (les chiffres varient entre 5 et 10 cm², selon les références, soit environ 5 % de la surface de la muqueuse, à comparer à environ 50 % chez le rat et 77 % chez le chien) ; s'y trouvent quelques millions de cellules nerveuses, en contact avec le milieu extérieur par l'intermédiaire du mucus nasal. De l'autre extrémité de chaque cellule part un axone qui, groupé avec d'autres pour former ce que l'on appelle un peu abusivement le nerf olfactif (première paire crânienne, la seule qui ne passe pas par le relais du thalamus), pénètre à la base du cerveau en traversant la lame criblée de l'ethmoïde puis les méninges, pour parvenir au bulbe olfactif, où se trouve le premier relais synaptique (figure 3.17).

Le bulbe olfactif est relié au système limbique par les bandelettes olfactives latérale et médiane. Au-delà du bulbe olfactif, les informations sont transmises par des neurones secondaires à de multiples structures (cortex piriforme, cortex entorhinal, noyau olfactif antérieur, tubercule olfactif, cortex périamygdalien). Un réseau de connexions associatives relie ces différents territoires et, depuis ces aires, d'autres neurones transmettent l'information vers des aires non spécifiquement olfactives comme l'hippocampe, l'hypothalamus ou le thalamus.

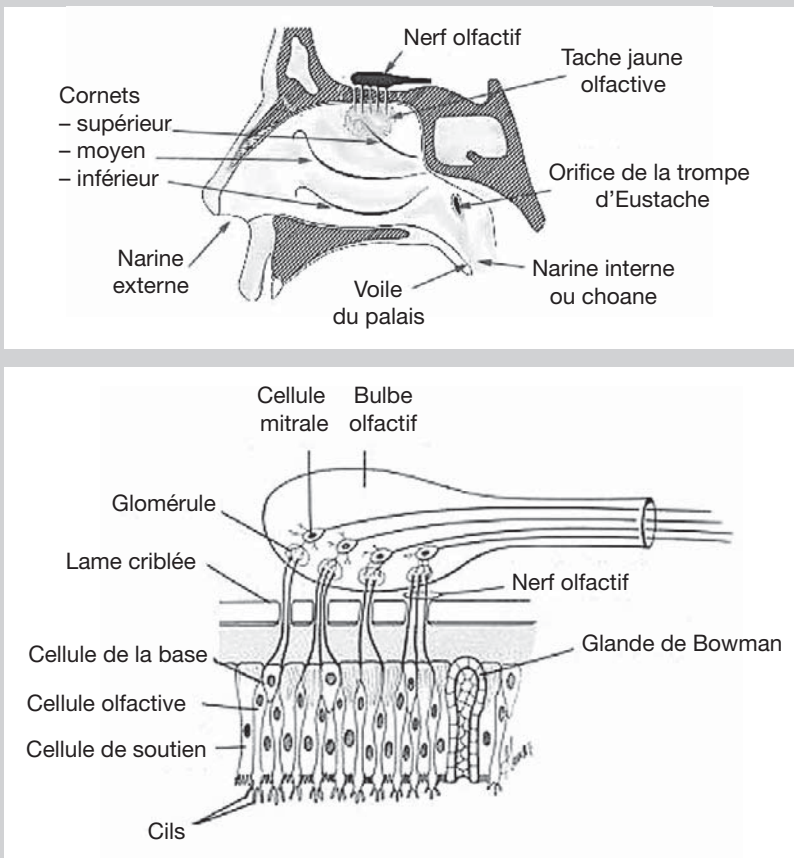


Figure 3.17. Aperçu d'ensemble d'une fosse nasale et détail de la naissance du nerf olfactif.

• Nerf trijumeau

Émergeant de la face antérieure du pont, le nerf trijumeau (cinquième paire), le plus volumineux des nerfs crâniens, reçoit sa dénomination de sa division en trois branches terminales. À la fois sensitif et moteur, il recueille les différentes sensibilités tactile, douloureuse et thermique des téguments de la face, des muqueuses des cavités du massif facial (sinusiennes, nasale et buccale) et des dents ; il innerve les muscles masticateurs. Il contient également des fibres sympathiques.

• Ganglions de la base

Les ganglions de la base sont un ensemble complexe (dit système extrapyramidal) de structures nerveuses situées, comme leur nom l'indique, à la base du cerveau. Les principales sont le striatum (comprenant le putamen et le noyau caudé), le globus pallidus (ou pallidum ; putamen et pallidum forment ce qu'on appelle le noyau lenticulaire), et la substance noire (*substantia nigra*).

Ces amas de cellules nerveuses, étroitement interconnectés, reçoivent également des informations en provenance de plusieurs régions du cortex cérébral. Une fois traitées par les ganglions de la base, ces informations retournent au cortex moteur en passant par le thalamus.

L'une des fonctions de cette boucle est vraisemblablement de sélectionner et de déclencher des mouvements volontaires harmonieux. Ce rôle dans l'initiation et le bon déroulement de la commande motrice apparaît clairement chez les personnes dont les ganglions de la base sont endommagés, comme c'est le cas lors de la maladie de Parkinson (atteinte des neurones dopaminergiques de la substance noire). On observe chez ces patients de la difficulté à commencer les mouvements qu'ils ont planifiés, des tremblements ainsi qu'une lenteur dans l'exécution de leurs gestes.

• **Hypothalamus**

Situé à la base du cerveau, de la taille d'un petit pois, l'hypothalamus a des fonctions importantes telles que contrôle de l'hypophyse, du système neurovégétatif - notamment pour le sommeil, la régulation de la température corporelle et du pouls - et participation aux processus mnésiques et affectifs.

• **Formation réticulée**

La formation (ou substance) réticulée s'étend de la moelle cervicale au diencephale, au centre du tronc cérébral. Elle se présente comme un réseau très dense de fibres, dans les mailles desquelles on trouve un grand nombre de cellules, dont certaines groupées en îlots. Elle forme un réseau multisynaptique très complexe où convergent des informations des trois grands systèmes sensitif, moteur et végétatif. Une même cellule réticulaire peut être activée par des stimuli auditifs, visuels, et tactiles provenant de plusieurs régions. L'activité de la formation réticulée conditionne le niveau d'activité générale du système nerveux et, finalement, de l'organisme.

• **Plexus choroïde**

Les cellules méningées qui tapissent les parois des ventricules cérébraux forment un épithélium spécialisé qui sécrète le liquide céphalorachidien.

• **Tectum et tegmentum**

Le tectum (« toit » en latin) est un épaississement de la substance grise à la surface dorsale du mésencéphale (partie moyenne du tronc cérébral ; dimension, environ 2 cm). Latéralement, des amas de substance grise plus mince forment le tegmentum (mot latin signifiant « enveloppe »).

• **Pont**

Le pont, situé au-dessus du bulbe rachidien, relie le tronc cérébral au cervelet. Il reçoit des informations des aires visuelles et retransmet les informations au cervelet, qui contrôle notamment la coordination des mouvements musculaires et le maintien de l'équilibre.

• **Fluide cérébrospinal**

Formé au niveau du plexus choroïde par des cellules spécialisées, le fluide cérébrospinal baigne le cerveau et la moelle épinière ; il transmet des hormones et des éléments nutritifs, joue le rôle de lubrifiant entre la membrane arachnoïde et la dure-mère, et draine les éléments toxiques éliminés par le cerveau.

• **Barrière hémato-encéphalique**

La barrière hémato-encéphalique est l'ensemble des structures séparant le sang du liquide cérébral interstitiel, protégeant le cerveau de toxiques potentiels. Elle est constituée de cellules vasculaires endothéliales reliées par des jonctions serrées ; l'étanchéité est induite et entretenue par les pieds des astrocytes de type 1, qui forment un manchon autour des capillaires cérébraux (figure 3.18). Elle est interrompue au niveau des organes circumventriculaires, entre autres par la barrière hématoméningée, structure constitutive des plexus choroïdes et des capillaires de l'espace sous-arachnoïdien.

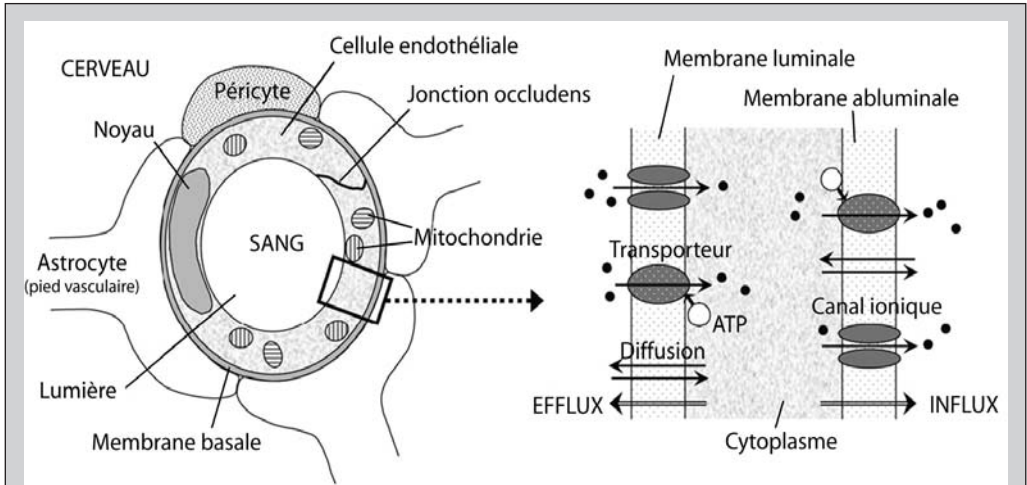


Figure 3.18. Schéma de la barrière hémato-encéphalique. D'après Yokel et Crossgrove (2004, page 60).

• Transport axonal

À l'intérieur d'un axone coexistent plusieurs modes de transfert de molécules nécessaires à son fonctionnement ou à sa croissance. Il y a ainsi un transport rapide associé à des vésicules (glycoprotéines, glycolipides, acétylcholinestérase, sérotonine, peptides ; vitesse 200 à 400 mm par jour), des vitesses intermédiaires (15 à 50 mm par jour, par des organelles comme les mitochondries ou des protéines comme la myosine) et lentes (0,2 à 4 mm par jour, par le cytosquelette). Le transport peut être antérograde (vers l'extrémité de l'axone), ou rétrograde. Arvidson a publié en 1994 une revue du transport axonal des métaux.

4.1. Passage d'éléments métalliques dans l'encéphale – Cas du manganèse (résumé)

Le manganèse (Mn) est un élément trace essentiel au développement et au fonctionnement du cerveau chez les mammifères (Smith, 1990 ; Keen et coll., 2000) ; le besoin quotidien a été estimé à environ 2 mg par jour pour l'adulte. Mn est un cofacteur des métalloprotéines du cerveau, telles que la glutamine synthétase spécifique des cellules gliales – elle représente 80 % de la concentration en Mn du cerveau – la superoxyde dismutase, ou encore la pyruvate carboxylase (Welder et Denman, 1984).

L'homme est exposé au Mn par ingestion (nourriture essentiellement) ainsi que par inhalation ; les concentrations atmosphériques environnementales de Mn sont de l'ordre de 0,01 à 0,07 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (OMS, 2000), la quantité de Mn pénétrant dans l'organisme à partir de cette source ayant été estimée entre moins de 2 $\mu\text{g}/\text{jour}$ hors de zones polluées, jusqu'à 10 μg par jour dans le cas contraire.

L'excès de Mn dans le cerveau provoque un syndrome de type parkinsonien, le manganisme (Hudnell, 1999 ; Iregren, 1999). Des atteintes neurotoxiques ont été rapportées chez des mineurs exposés au bioxyde de manganèse par inhalation (Couper, 1837), chez des travailleurs produisant des piles sèches (Kee et Lönnerdal, 1995), chez des enfants administrés à long terme 0,8 à 1 μmol Mn par kilo, et chez des personnes buvant de l'eau contaminée (Hudnell, 1999). Pour éviter des effets indésirables de l'exposition à long terme au Mn, l'ATSDR (2000) et l'EPA (2003) ont recommandé chez l'adulte de ne pas dépasser les niveaux respectivement de 0,07 et 0,14 mg/kg.j par ingestion, et de 0,04 et 0,05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ par inhalation. La norme proposée par l'OMS (2000) pour la qualité de l'air est de 0,15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour l'Europe.

Inhalé, le Mn pénètre directement dans la circulation sans subir une première élimination par le foie, ce qui provoque des niveaux sanguins nettement supérieurs à ceux qui résultent d'une ingestion en quantité similaire (Andersen, 1999). De plus, le manganèse inhalé peut pénétrer directement dans le cerveau par le bulbe olfactif ; la solubilité influence la vitesse de pénétration ($\text{MnCl}_2 \gg \text{MnO}_2$; Roels et coll., 1997 ; voir Aschner et coll., 2002 ; Dorman et coll., 2001).

L'accumulation du Mn nuit à la transmission nerveuse, notamment aux systèmes dopaminergiques (Verity, 1999), et l'empoisonnement est marqué par l'atteinte de nombreuses structures ganglionnaires de la base (ATSDR, 2000).

Chez des singes, des concentrations élevées de Mn ont été retrouvées dans le noyau caudé, le noyau lenticulaire et la substance noire (Newlan et coll., 1989) et, chez le rat, dans les ganglions de la base (Kabata et coll., 1989). Des zones de forte densité, observées par résonance magnétique nucléaire pondérée en T1, attribuées à la présence de Mn, ont été observées dans les ganglions de la base (notamment le globus pallidus), le tectum et le tegmentum du cerveau moyen et du pont (Eiima et coll., 1992 ; Ono et coll., 1995 ; Fitzgerald et coll., 1999 ; Nagatomo et coll., 1999 ; Masumoto et coll., 2001).

(...)

4.1.1. Toxicocinétique

La concentration normale du Mn dans le plasma est d'environ « 20 nM » (*sic* ; soit 11 $\mu\text{g}/\text{l}$; Keen et coll., 2000) ; une faible partie se trouve sous forme d'espèces susceptibles de traverser la barrière hémato-encéphalique. Des considérations thermodynamiques indiquent que le Mn^{++} sérique pourrait se trouver sous différentes formes : lié à l'albumine (84 %), ion hydraté (6,4 %), ou complexes équimolaires avec le bicarbonate (5,8 %), le citrate (2,0 %) et d'autres ligands de faibles masses molaires (1,8 % ; Harris et Chen, 1994). Le Mn^{+++} se trouverait presque totalement lié à la transferrine (Aisen et coll., 1969 ; Harris et Chen, 1994). (...)

Une fois dans le sang, le manganèse est rapidement distribué à d'autres compartiments ; sa demi-vie sanguine a été évaluée à 1,83 heure chez le rat Sprague-Dawley après injection i.v. (Zhang et coll., 2000). La demi-vie dans les os et le cerveau (> 50 jours) est supérieure à celle dans la plupart des autres tissus (10 à 15 jours). (...) Dans ce dernier, le Mn se concentre dans le *corpus striatum* et le *globus pallidus*, où il demeure pendant des semaines ou des mois.

(...)

| Afflux du manganèse au cerveau

Le manganèse peut passer du plasma au cerveau par les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, ou des plexus choroïdes au fluide cérébrospinal, puis au cerveau (Bradbury, 1997). L'afflux ou l'efflux ont lieu par diffusion ou par transport actif, vitesse et volume dépendant de la taille, de la charge et de la forme de la molécule. Aux concentrations physiologiques, l'afflux ne serait pas saturable et passerait principalement par l'endothélium capillaire de la barrière hémato-encéphalique ; à fortes concentrations, l'afflux était saturable et passait surtout par le fluide cérébrospinal (Murphy et coll., 1991 ; Rabin et coll., 1993).

Chez le rat, des études par instillation intranasale ont montré une accumulation de Mn dans le bulbe olfactif, ainsi qu'une absorption significative dans d'autres régions du cerveau après 7 jours (Tjälve et coll., 1996). Chez l'homme, le manganèse s'accumule préférentiellement dans les ganglions de la base, spécialement le *globus pallidus* et la substance noire (Hauser et coll., 1996 ; Lucchini et coll., 2000). Le mécanisme de l'atteinte neuronale n'est que partiellement compris ; quelques études ont rapporté une perte de dopamine striatale et des morts cellulaires dans le *globus pallidus* (Liccione et Maines, 1988). Une concentration excessive de Mn dans le cerveau peut provoquer la mort neuronale en interférant avec les fonctions des mitochondries (Gunter et coll., 2004 ; Li et coll., 2003 ; Malecki, 2001). (...)

Le tableau 3.IX fait un point relatif au transport de manganèse au cerveau *via* les fosses nasales.

Selon le Comité de relecture du rapport de Yokel et Crossgrove (*Health Review Committee*, pp. 59-73), ces deux auteurs ont fourni des indications convaincantes d'un transport actif du Mn vers le cerveau, et montré qu'en revanche l'efflux n'a lieu que par diffusion. Un rôle du DMT-1, transporteur spécifique du fer, serait exclu ; en effet, des rats dépourvus de cette protéine incorporent Mn de la même façon que des rats normaux. Il semble vraisemblable que plusieurs mécanismes de transport actif interviennent en fonction des espèces du manganèse, la complexité des phénomènes étant renforcée par une redistribution rapide entre les différentes espèces chimiques (Reaney et coll., 2002). L'élimination du Mn du cerveau par diffusion seulement implique la possibilité de son

Composé	Espèce et voie d'administration	Résumé des observations	Références
$^{54}\text{MnCl}_2$	Truite, rat, anguille, voie intranasale	^{54}Mn a été rapidement transmis le long des neurones olfactifs primaires, a passé les synapses bulbaires et s'est répandu largement dans le cerveau (et la moelle épinière, chez le rat).	Rouleau et coll. (1995), Tjälve et coll. (1995), Henriksson et coll. (1999)
MnCl_2	Rat, instillation intranasale	Après instillation unilatérale, la concentration ipsilatérale de Mn dans le bulbe olfactif a atteint un maximum après 12 heures et est restée élevée pendant 3 jours. Après instillations répétées, la concentration était également élevée dans le striatum (ipsilatéral).	Gianutsos et coll. (1997)
$^{54}\text{MnCl}_2$	Rat, injection dans le bulbe olfactif	Un jour après l'injection, ^{54}Mn a été mis en évidence dans les zones ipsilatérales des cortex piriforme et entorhinal et du complexe amygdalien, montrant un transport de Mn jusqu'au cortex olfactif.	Takeda et coll. (1998)
MnCl_2	Rat, instillations intranasales (1 à 3 doses de 0, 10, 250, ou 1 000 μg par semaine)	Des dosages ELISA de protéine fibrillaire acide et de S-100b dans les astrocytes ont montré une baisse dose-dépendante dans le cortex olfactif, le thalamus, l'hypothalamus et l'hippocampe, montrant que les astrocytes sont des cibles initiales du Mn.	Henriksson et Tjälve (2000)

Tableau 3.IX. Transport de Mn vers le cerveau par les voies olfactives (d'après Sunderman, 2001. Les références ne sont pas reprises dans la bibliographie).

accumulation et d'effets à long terme, par ailleurs démontrés chez l'homme par de nombreuses études.

Le Comité de relecture conclut que des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier de façon sûre les transporteurs impliqués, ce qui permettrait de comprendre la distribution du Mn dans les différentes régions du cerveau et de faire le lien avec les conséquences neurologiques.

4.1.2. Discussion

Ce rapport de Yokel et Crossgrove (2004) a l'intérêt de montrer que les mécanismes possibles du passage au cerveau d'éléments métalliques sont multiples et complexes, n'excluent pas la diffusion passive, notamment pour ce qui est de l'efflux, et impliquent probablement plusieurs agents de transport actif. Il est également rappelé la nette influence de l'espèce chimique en jeu et de sa solubilité. Si certains mécanismes peuvent

être partagés par d'autres éléments métalliques, chaque toxique présente cependant un profil toxicologique propre (voir Tjälve et Henriksson, 1999).

| Possibilités de réactions locales

En sus d'une augmentation de la concentration en Mn dans le bulbe olfactif, le striatum, et le cervelet, des effets d'irritation locaux (épithélium nasal) ont également été mis en évidence chez le rat après inhalation subchronique d'aérosols de sulfate de Mn (Dorman et coll., 2004).

| Espèces peu solubles du manganèse - Influence de la granulométrie

L'une des limitations du rapport de Yokel et Crossgrove (2004) est qu'il ne distingue pas nettement entre voies de pénétration envisagées dans le cerveau, circulation sanguine ou voie nerveuse, ni entre espèces solubles ou « insolubles » (qui seraient transportées sous forme de particules).

Sierra et coll. (1998) ont montré que Mn passait dans le cerveau de pigeons (*Columba livia*) après exposition à une espèce insoluble, Mn_3O_4 (22 pigeons exposés à $239 \mu g/m^3$, 7 h/j, 5 j/sem, pendant 5, 9 ou 13 semaines). Ils n'ont toutefois pas décelé de manifestation toxique, soit que l'exposition ait été insuffisante en durée ou concentration, soit que la durée de suivi ait été trop courte, soit que le pigeon soit relativement insensible à ce type d'effet.

Bench et coll. (2001) ont mis en évidence la pénétration de Mn et de Cd dans le bulbe olfactif d'écureuils ; les données indiquent qu'elle se produit par voie inhalatoire. Il s'agit probablement d'espèces peu solubles, en raison de la lixiviation des sols par la pluie. L'importance du transfert était supérieure d'un facteur mille à celle estimée pour le bétail par un calcul de transfert par voie orale.

Dorman et coll. (2001) ont comparé chez le rat les effets de $MnSO_4$ ou de Mn_3O_4 (exposition à 0, 0,03, 0,3 ou $3 \text{ mg}/m^3$ de Mn, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, pendant 2 semaines). Des concentrations accrues de Mn ont été trouvées pour Mn_3O_4 après l'exposition la plus forte, dans le bulbe olfactif et le striatum, mais elles étaient plus élevées avec le sulfate ; l'inverse était vrai dans le poumon.

Ces travaux ont été confirmés l'année suivante (Dorman et coll., 2002a) en utilisant cette fois du phosphate de manganèse $^{54}MnHPO_4$ (réputé peu soluble dans les fluides biologiques, bien qu'il le soit plus que Mn_3O_4 ; Vitarella et coll., 2000), et une modalité de pénétration asymétrique, en bouchant l'une des narines du rat (respirateur nasal obligé). Tant les différences de concentration (épithélium nasal, bulbe et nerf olfactif,

tubercule olfactif) ipsilatérales ou contralatérales que des $T_{1/2}$ d'élimination comparées à celles du $MnCl_2$ (phase rapide comme phase lente) montrent la pénétration du Mn dans le cerveau directement par la voie nasale, et l'influence de la solubilité. Ainsi que le suggéraient Vitarella et coll. (2000), tout se passe comme s'il y avait possibilité de coexistence de mécanismes de pénétration par diffusion ou par transport de particules non dissoutes (en l'occurrence non intracellulaire, vu les tailles de particules utilisées, MMAD 1,68 μm , à moins d'un transport préférentiel des plus petites tailles).

Dorman et coll. (2002b) ont également confirmé la présence de Mn dans le bulbe olfactif de rats exposés par inhalation à 0,42 mg/m³ de Mn_3O_4 .

Yu et coll. (2003) ont exposé des rats mâles Sprague-Dawley à des fumées de soudage ($63,6 \pm 4,1$ mg/m³, correspondant à 1,6 mg/m³ de Mn, ou $107,1 \pm 6,3$ mg/m³, correspondant à 3,5 mg/m³ de Mn), 2 heures par jour pendant 2 mois ; le manganèse y est considéré comme sous forme de PUF et très peu soluble (oxydes, spinelles). Des augmentations statistiquement significatives de la concentration de Mn ont été constatées notamment dans la substance grise, les ganglions de la base, et les cortex temporal et frontal.

Comparant trois espèces différentes de Mn (métal, sulfate et/ou phosphate en aérosols à environ 3 mg/m³), Normandin et coll. (2004) constatent, chez le rat exposé par inhalation 13 semaines consécutives, que la concentration cérébrale de Mn n'est pas significativement augmentée avec le métal, lequel ne provoque pas non plus d'effets locomoteurs (voir Roels et coll., 1997, comparant $MnCl_2$ et MnO_2 par différentes voies n'incluant pas les voies nasale ou inhalatoire).

Feikert et coll. (2004) ont exposé par inhalation des rats (nombre non précisé) à des nanoparticules peu solubles de MnO_2 (31 nm), pendant des durées atteignant 11 jours, soit avec les deux narines libres, soit la narine droite obturée. Après ces 11 jours, les concentrations en Mn des poumons, foie, reins, bulbe olfactif et diverses régions cérébrales (striatum, cortex frontal et cérébral) étaient nettement augmentées (d'un facteur 3,6 dans le bulbe olfactif, d'un facteur 2 pour les poumons). La concentration du TNF- α était augmentée d'un facteur de l'ordre de 30 dans le bulbe olfactif, et augmentait également dans les régions cérébrales où la concentration de Mn augmentait. Les auteurs concluent que le passage de PUF solides au système nerveux central *via* le nerf olfactif est très efficace chez le rat ; ils pensent, en dépit des différences physiologiques évidentes, qu'un mécanisme similaire existe probablement chez l'homme. Telle est également la conviction de Elder et coll. (2006), après exposition de rats mâles Fischer 344 par inhalation ou instillation à des PUF (particules primaires de 3 à 8 nm, agglomérats d'environ 30 nm) d'oxydes de Mn (61 % de MnO, 39 % de Mn_2O_3) peu solubles (solubilisation évaluée à moins de 1,5 % par jour) et comparaisons avec $MnCl_2$. Par exemple, si la solubilité des particules d'oxyde était un facteur important de leur distribution vers le cerveau, le Mn serait retrouvé uniformément réparti dans le bulbe olfactif même après obturation d'une narine, ce qui n'est pas le cas. Des examens histopathologiques n'ont malheureusement pas été réalisés.

| Pénétration par le nerf trijumeau

Une autre voie de pénétration potentielle a été mise en évidence par Lewis et coll. (2005) : la cavité nasale est également innervée par la branche maxillaire du nerf trijumeau. Ces travaux, réalisés avec MnCl_2 , très soluble, seraient à confirmer avec des composés peu solubles du Mn et des particules ultrafines (la granulométrie de l'aérosol de MnCl_2 était de l'ordre de 2 à 3 μm). Ils ont toutefois le mérite de montrer que la voie du nerf trijumeau ne saurait être négligée.

| Transporteurs actifs potentiels

En 1937, des chercheurs découvraient indépendamment la présence de fortes concentrations de carnosine (β -alanyl-L-histidine) dans le bulbe et l'épithélium olfactifs de souris. Après traitement par le sulfate de zinc, la carnosine disparaissait et sa synthèse locale, spécifiquement effectuée à partir de β -alanine (qui ne sert pas localement à la production d'autres peptides ou protéines), devenait très faible ou indétectable. Synthétisée par une enzyme spécifique dans les axones olfactifs périphériques, elle est rapidement transportée jusqu'aux glomérules du bulbe olfactif ; la carnosine pouvant complexer les espèces Ni(II) , Cd(II) , Zn(II) , Cu(II) et d'autres ions métalliques, elle pourrait jouer un rôle dans l'atténuation de leurs effets potentiels aussi bien que pour leur transport dans le cerveau (d'après Sunderman, 2001).

L'un des transporteurs actifs du Mn le long de la voie olfactive est la métallothionéine, ainsi que l'ont montré Persson et coll. (2003) chez l'anguille et le rat. La métallothionéine intervient également pour le transport du cadmium par la voie olfactive, chez l'anguille et chez le rat (Tallkvist et coll., 2002)

4.2. Passage d'autres espèces chimiques au cerveau *via* les fosses nasales

En raison de nombre de similitudes avec Mn, Fe pourrait également passer au cerveau *via* le nerf olfactif. Le fer partage en effet avec Mn diverses caractéristiques parmi lesquelles un rayon ionique similaire, une charge identique en milieu physiologique, une accumulation préférentielle dans les mitochondries, la complexation par la transferrine, et même un transporteur commun. Selon Rao et coll. (2003), il n'en est rien, et le fer, même sous la forme relativement soluble de sulfate, ne passe pratiquement pas par cette voie.

Le tableau 3.X, emprunté à Sunderman (2001), fait un point relatif au transport vers le cerveau *via* les fosses nasales d'éléments métalliques autres que Mn.

Métal	Composé	Espèce et voie d'administration	Remarques	Références
Al	Lactate, $AlCl_3$	Lapin, implants nasals.	Formation dans le bulbe olfactif et le cortex cérébral de granulomes contenant Al.	Perl et Good (1987)
	Acétyl-acétionate d'Al	Rat, inhalation, 3 fois par semaine pendant 2 semaines.	Al a été détecté par la morine dans le bulbe olfactif, le bulbe rachidien et le pont, l'hippocampe et le cer-velet.	Zatta et coll. (1993)
	Chlorhy- drate d'Al-c	Rat, inhalation, 6 heures par jour pendant 12 jours.	Accumulation d'Al dans le bulbe olfactif (PIXE).	Divine et coll. (1999)
Cd	$^{109}CdCl_2$	Truite, Cd ajouté à l'eau de l'aqua- rium.	^{109}Cd détecté dans la rosette olfac- tive, le nerf olfactif, et le bulbe olfactif.	Tjälve et coll. (1986)
	$^{109}CdCl_2$	Anguille, rat, application intra- nasale unilatérale.	^{109}Cd mis en évidence dans le bulbe olfactif ipsilatéral par autoradio- graphie et γ -spectrométrie, sans passage des synapses vers les neu- rones olfactifs secondaires.	Gottofrey et Tjälve, (1991), Tjälve et coll. (1996)
	$^{109}CdCl_2$	Rat, instillation intranasale.	Après instillation unilatérale, la concentration ipsilatérale de ^{109}Cd dans le bulbe olfactif est environ 40 fois celle contralatérale.	Hastings et Evans (1991), Evans et Has- tings (1992)
	$^{109}CdCl_2$	Rat, inhalation, 5 heures par jour pendant 20 semaines.	Accumulation de ^{109}Cd dans le bulbe olfactif ; l'odorat n'est pas affecté.	Sun et coll. (1996)
Co	$^{57}CoCl_2$	Rat, instillation intranasale.	Du ^{57}Co est passé du nerf olfactif au bulbe olfactif ; il en a été détecté dans des neurones olfac- tifs secondaires.	Persson et coll. (1998, 2003)
Hg	$^{203}HgCl_2$	Anguille, voie intranasale.	Du ^{203}Hg est passé des neurones olfactifs au bulbe (ipsilatéral) ; un transfert vers des neurones secon- daires n'a pas été détecté.	Borg-Neczak et Tjälve (1996)
	$^{203}HgCl_2$	Rat, instillation intranasale.	Après 1 et 3 semaines, le nerf et le bulbe olfactifs recelaient plus de ^{203}Hg en ipsilatéral qu'en contralatéral ; aucun transfert vers les neurones olfactifs secondaires n'a été observé.	Henriksson et Tjälve (1998)

Tableau 3.X. Transport de métaux vers le cerveau par les voies olfactives. (D'après Sunderman, 2001. Les lignes relatives au Mn font l'objet du tableau 3.IX. Les références ne sont pas reprises dans la bibliographie.)

Ni	$^{63}\text{NiSO}_4$, ^{63}NiO	Rat, singe, inhalation.	^{63}Ni a été détecté dans le bulbe olfactif de 2 à 20 semaines après inhalation de particules de $^{63}\text{NiSO}_4$ soluble, mais non après inhalation de ^{63}NiO insoluble.	Lewis et coll. (1994)
	$^{63}\text{NiCl}_2$	Rat, anguille, voie intranasale.	Un transport lent de ^{63}Ni a été observé des neurones olfactifs au bulbe. ^{63}Ni était lié à des constituants particuliers ou solubles du cytosol ; il était visible dans le pédoncule olfactif, le tubercule olfactif et le cortex.	Henriksson et coll., (1997) Tallkvist et coll. (1998)
Zn	$^{65}\text{ZnCl}_2$	Rat, injection directe dans le bulbe olfactif.	24 H après l'injection, ^{65}Zn était présent (en ipsilatéral) dans le cortex piriforme, les noyaux amygdaloïdes, et la commissure antérieure, ce qui est compatible avec son transport le long du nerf olfactif.	Takeda et coll. (1997)
	$^{65}\text{ZnCl}_2$	Rat, instillation intranasale.	^{65}Zn est passé dans les glomérules du bulbe olfactif <i>via</i> les neurones olfactifs primaires. Un passage lent de ^{65}Zn a également été mis en évidence vers les neurones secondaires.	Persson et coll. (1998)

Tableau 3.X. (suite) Transport de métaux vers le cerveau par les voies olfactives. (D'après Sunderman, 2001. Les lignes relatives au Mn font l'objet du tableau 3.IX. Les références ne sont pas reprises dans la bibliographie.)

4.2.1. Substances inorganiques de faible solubilité

Le tableau 3.X évoque des substances inorganiques plus ou moins solubles dans l'eau ; le cas de substances – et, plus encore, de particules – inorganiques choisies spécifiquement pour leur « insolubilité » semble avoir été peu étudié. De Lorenzo, dans un ouvrage de 1970, rapporte le suivi par microscopie électronique de nanoparticules d'or radioactif (^{198}Au , taille 50 nm) après instillation intranasale chez des singes écureuils (*Saimiri sciureus*). Ces dernières ont été retrouvées après 15 minutes à l'extrémité des récepteurs olfactifs et atteignaient le bulbe olfactif (mitochondries de dendrites de cellules mitrales) en 30 à 60 minutes. La vitesse de progression dans le neurone olfactif était estimée à 2,5 mm/heure (selon Oberdörster, 2004, Bodian et Howe avaient trouvé en 1941 pratiquement la même vitesse de transport axonal du virus de la poliomyélite chez le chimpanzé après instillation intranasale). La même année, Czerniawska confirmait ces résultats après injection sous la muqueuse olfactive chez le lapin ; l'or radioactif était retrouvé dans le fluide cérébrospinal une

demi-heure à une heure plus tard (cité par Illum, 2000). En 1978, Gopinath et coll. montraient chez le singe rhésus que ces mêmes particules pénétraient aussi dans les cellules de soutien de la muqueuse olfactive, où elles étaient soit isolées, soit agrégées à l'intérieur des mitochondries. Elles étaient encore observées dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de la lamina propria (sous-couche de l'épithélium), mais pas dans les espaces intercellulaires de la muqueuse olfactive (cité par Illum, 2000). Signalons que Li et coll. (2003) ont également trouvé des nano-particules et, à un moindre degré, des micro-particules issues de la pollution environnementale dans les mitochondries des macrophages alvéolaires, où elles provoquent des dommages structurels notables.

Lewis et coll. ont détecté du ^{63}Ni dans le bulbe olfactif de rats et de singes après inhalation subaiguë de particules contenant du Ni soluble ($^{63}\text{NiSO}_4$), mais pas après exposition à des particules contenant du ^{63}NiO , insoluble (Lewis et coll., 1994, cité par Sunderman, 2001 ; l'ouvrage original de Lewis n'a pas été trouvé).

La présence de particules de la pollution urbaine dans des cellules épithéliales de la fosse nasale, aussi bien que dans les espaces intercellulaires, a été mise en évidence par Calderón-Garcidueñas et coll. (2001) chez des enfants fortement exposés (ville de Mexico). Les altérations marquées de l'épithélium nasal et de l'épuration ciliaire pourraient en être en partie la conséquence (en partie, car l'ozone et les aldéhydes, par exemple, peuvent contribuer à cette dégradation), mais témoignent de toute façon d'un affaiblissement des défenses naturelles de l'organisme.

Calderón-Garcidueñas et coll. (2003) ont examiné les atteintes des épithéliums nasals et olfactifs de chiens de tout âge vivant à Mexico, comparés à des chiens vivant en milieu nettement moins pollué (Tlaxcala). Ils ont rapporté que Ni et V (traceurs de la pollution par combustion) sont présents en concentrations décroissantes dans l'ordre : muqueuse olfactive, bulbe olfactif, cortex frontal ; de plus, les sites apuriques/apyrimidiques (témoignant d'atteintes de l'ADN) sont plus nombreux dans l'hippocampe, le bulbe olfactif et le cerveau, et les protéines inflammatoires et de stress apparaissent précocement dans ce dernier. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'une telle pollution pourrait participer à la prévalence de la maladie d'Alzheimer, hypothèse à nouveau exprimée après examens de tissus de cerveaux humains (Calderón-Garcidueñas et coll., 2004). Cette piste de recherche commence à être explorée sur le plan expérimental (Block et coll., 2004 ; Veronesi et coll., 2005) et semble de plus en plus considérée comme plausible (Peters et coll., 2006).

Günther Oberdörster et coll. (Oberdörster, 2004 ; Oberdörster et coll., 2004) ont mis en évidence la présence dans le bulbe olfactif de rats de carbone radioactif (^{13}C , particules de taille 36 nm) de 1 à 7 jours après une exposition de 6 heures par inhalation ; la concentration dans le poumon décroissait de 1,39 (jour 1) à 0,59 $\mu\text{g/g}$ (jour 7), tandis que celle dans le bulbe olfactif croissait de 0,35 à 0,43 $\mu\text{g/g}$. Pour les auteurs, le

mécanisme le plus probable est celui du dépôt sur la muqueuse olfactive suivi d'une translocation le long du nerf olfactif ; ils évaluent à 20 % du dépôt la proportion des PUF pouvant passer au bulbe olfactif. En revanche, Semmler et coll. (2004), utilisant des particules insolubles d'iridium (^{192}Ir ; taille des particules 15 nm ou 80 nm [diamètre médian en nombre], écart-type géométrique 1,6 nm), observent de très faibles transferts au cerveau et au foie (< 1 % de la dose totale ; le foie était l'organe cible principal chez Oberdörster et coll., voir Oberdörster et coll., 2002), avec peut-être une concentration maximale vers le 7^e jour après exposition, suivie d'une décroissance (les concentrations mesurées sont très faibles et les écarts-types importants). L'une des hypothèses de Semmler et coll. pour expliquer de telles différences entre observations est que les nanoparticules de ^{13}C se désagrègent nettement plus vite et plus complètement que celles de ^{192}Ir , passent donc plus rapidement dans la circulation générale et peuvent par conséquent atteindre plus rapidement des organes distaux.

Eva Oberdörster (2004) a exposé de jeunes poissons (il s'agit de l'achigan à grande bouche [perche noire d'Amérique], *Micropterus salmoides*) à une suspension aqueuse colloïdale de 0,5 ppm de fullérène (C_{60}). Une peroxydation lipidique notable (17 fois supérieure à celle chez les témoins, $p < 0,01$) a été observée (par réaction avec l'acide thiobarbiturique) dans les cerveaux des poissons exposés pendant 48 heures ; il y a stress oxydant et déplétion en glutathion, comme l'avaient déjà montré Li et coll. (2003) sur macrophages et cellules épithéliales. Le mécanisme de cet effet reste à découvrir.

Block et coll. (2004) ont montré que des particules diesels faisaient preuve d'une toxicité sélective envers les neurones dopaminergiques, après activation des microglies (cellules gliales se transformant en phagocytes).

Dans la même veine, Veronesi et coll. (2005) ont mis en évidence la dégénérescence de neurones dopaminergiques chez des souris « knock-out » Apo-E^{-/-} exposées à des particules environnementales après concentration. Le nombre de neurones du *nucleus compacta* de la substance grise colorés par la tyrosine hydroxylase (neurones dopaminergiques) était significativement réduit de 29 % par rapport aux souris témoins ; de même 8 % d'astrocytes en plus ($p < 0,05$) réagissaient à un marquage spécifique (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*). Or ces neurones sont une des cibles de la maladie de Parkinson, élément qui renforce les hypothèses de Calderón-Garcidueñas et coll. (2004) déjà évoquées.

Kim et coll. (2006) ont étudié chez des souris mâles ICR la toxicité et la distribution de nanoparticules magnétiques (50 nm, recouvertes d'une épaisseur contrôlée de silice et rendues fluorescentes) après injections intrapéritonéales (100, 50 et 25 mg/kg sur 4 semaines). Aucun symptôme de toxicité n'a été observé (suivi sur 4 semaines). Les particules se répartissaient dans tout l'organisme, y compris le cerveau, auquel elles parvenaient sans interaction apparente avec la barrière hémato-encéphalique ; un organe où les particules étaient relativement peu présentes était le poumon. Si de telles

particules semblent bien tolérées à court terme et dans ces conditions, la durée de suivi est insuffisante pour évaluer d'éventuels effets à long terme.

Shwe et coll. (2006) ont étudié le passage dans le bulbe olfactif de nanoparticules de noir de carbone (14 ou 95 nm) après instillations (une fois par semaine pendant 4 semaines) dans la fosse nasale de souris mâles. Constatant des réactions inflammatoires au niveau du bulbe olfactif 4 h après la dernière instillation dans le cas des particules les plus petites, les auteurs supposent qu'elles ont pu y parvenir (apparemment sans passer aux neurones secondaires), ce qui ne semblait pas le cas pour les particules de 94 nm.

4.2.2. Polymères organiques insolubles

Brooking et coll. (2001) ont montré le transport, à travers la muqueuse nasale de rats, de nanoparticules de latex de différentes tailles et revêtements de surface, marquées à l'iode 125. Les particules étaient détectées dans le sang après 5 minutes, leur concentration atteignait un maximum en une heure puis restait stable pendant 2 heures. Les plus petites (20 nm) passaient plus largement (maximum de l'ordre de 3,3 % de la dose) que les plus grosses (1 000 nm). Des particules de 100 nm revêtues de chitosan (le chitosan est un dérivé de la chitine constituant la carapace des crustacés) passaient de façon à la fois plus rapide et plus importante, la concentration sanguine maximale étant atteinte en 15 minutes. Les auteurs font l'hypothèse que le passage est dû essentiellement à un transport transcellulaire au niveau du tissu lymphoïde associé à la muqueuse de la cavité nasale (cercle de Waldeyer chez l'homme) notamment par les cellules M, même si un transport paracellulaire ne peut être exclu, notamment dans le cas des particules les plus petites, en particulier celles revêtues de chitosan.

Note. Le cercle de Waldeyer se compose de formations lymphoïdes disposées à l'entrée de la gorge et des fosses nasales. Un passage transépithélial de particules pourrait notamment se produire par des cellules spécialisées, dites cellules M (Kraehenbuhl et Neutra, 2000).

De façon similaire, la translocation de microsphères de carboxy-polystyrène (diamètre 1,1 μm) ou de poly(styrène-divinylbenzène) radiomarké (diamètre 7 μm) a été étudiée après instillation intranasale (10 ou 50 μL) chez la souris BALB/c. Dans la première expérience (Eyles et coll., 2001a), un nombre appréciable de microsphères ont été détectées dans les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse nasale et les ganglions lymphatiques périphériques. Dix jours après instillation, les rates des souris contenaient significativement plus de microsphères, pour le volume d'instillation le plus élevé. Les résultats sont en faveur d'une possible translocation des microparticules (dépendant du dépôt intranasal) dans le compartiment systémique du système immunitaire. Dans la seconde expérience (Eyles et coll., 2001b), on observait après 576 heures, pour le volume instillé le plus élevé, une certaine radioactivité au niveau du foie (0,3 %) et de

la rate (0,04 %). Il est probable que, toutes choses égales par ailleurs, la translocation eût été à la fois plus rapide et plus importante avec des nanoparticules plutôt qu'avec des microparticules.

Vila et coll. (2004) ont montré que des particules de chitosan (taille 350 nm) peuvent traverser l'épithélium nasal. Le passage a lieu par les cellules épithéliales ordinaires (observation au microscope confocal à laser), mais pourrait également se produire par des cellules du tissu lymphoïde associé, comme cela semble bien être le cas pour les streptocoques (Cleary et coll., 2004) ou des rétrovirus (Velin et coll., 1997). Rappelons que la pénétration peut être rapide et dépendre de la taille des PUF et d'un revêtement de surface (Brooking et coll., 2001, résumé plus haut).

Yang et coll. (2004) ont mis en évidence chez le rat la possibilité d'un passage au cerveau (dans le fluide extracellulaire interstitiel), depuis la circulation générale et à travers la barrière hémato-encéphalique, de nanosphères de polystyrène modifié (carboxylé et fluorescent ; taille des particules 20 nm). Ce passage est toutefois observé dans des conditions particulières d'ischémie cérébrale provoquée, suivie de reperfusion ; il est connu que l'hypoxie provoque une modification de la perméabilité de cette barrière. En l'absence d'ischémie, les nanosphères restaient dans les vaisseaux sanguins.

4.3. Discussion

4.3.1. Possibilités de réactions locales

La présentation de Yokel et Crossgrove (2004) pourrait laisser oublier les enseignements apportés par la mise en œuvre de sprays nasaux à base de composés ioniques de zinc (tels que sulfate ou gluconate). En 1938, un spray nasal à 1 % de ZnSO_4 fut testé aux États-Unis dans le but de protéger les enfants de la poliomyélite ; le traitement, inefficace, provoqua en revanche des anosmies, passagères ou durables (voir Childers, 2004). On observa par la suite que l'épithélium olfactif de rats dégénérait rapidement après lavage nasal par une telle solution, ce qui entraînait une dégénérescence secondaire du bulbe olfactif (voir Chang et coll., 2003). Ce traitement fut ensuite utilisé, en lieu et place de l'ablation de ce dernier, pour induire une anosmie expérimentale chez divers animaux (rongeurs, poissons, oiseaux, tortues ; d'après Sunderman, 2001).

Une revue générale des effets de métaux (chrome, nickel, arsenic, cadmium...) sur les voies nasales (de l'hyposmie au cancer en passant par la perforation de la cloison nasale) a été présentée par Sunderman (2001 ; voir également Feron et coll., 2001, plus orientée vers les substances organiques). Un chapitre est dédié au transport des métaux par le nerf olfactif, mais il se rapporte presque uniquement à des composés solubles.

4.3.2. Importance de la surface ou d'un revêtement de la particule

| Généralités

La surface d'une particule peu soluble, ultra-fine ou non, seule accessible aux réactions dans l'organisme après pénétration, a nécessairement une incidence sur les effets qu'elle induit. Or soit cette surface a plus ou moins adsorbé des espèces chimiques de son environnement, soit elle a été volontairement traitée pour lui conférer des propriétés spécifiques (par exemple pour limiter la tendance à l'agrégation, augmenter la stabilité d'une suspension ou d'une émulsion, réduire la formation de radicaux libres sous irradiation lumineuse, ou encore diriger la particule vers un organe déterminé). On peut dire, de ce point de vue, que la surface d'une particule dépend de son histoire, et que ses propriétés toxicologiques peuvent résulter en tout ou partie de cette histoire.

Rappelons à ce sujet les considérations générales de l'ECVAM (Fubini et coll., 1998).

« La surface des solides tend à être hétérogène par nature, et sa composition diffère souvent de celle de la masse du solide. Divers facteurs modulent la réactivité de surface, parmi lesquels : a) la granulométrie ; b) l'origine du matériau ; c) sa cristallinité et les plans cristallographiques exposés ; d) la composition de la surface ; et e) la présence de contaminants traces à la surface. Il en résulte que différents échantillons du même matériau pourront présenter des toxicités différentes. »

« Des surfaces fraîchement formées ont une réactivité de surface spécifique – un exemple emblématique est celui des particules de quartz formées mécaniquement, mais ceci est valable pour beaucoup d'autres matériaux – et une toxicité supérieure à celle de particules vieilles. »

« Toute surface solide adsorbe des molécules environnantes, en fonction de sa composition et de sa topographie. (...) Ainsi, les cellules et tissus se trouvent au contact d'un solide déjà recouvert d'une ou plusieurs couches hétérogènes. (...) En moins d'une seconde, des protéines sont observées à la surface de biomatériaux, et une monocouche de protéines se forme en quelques minutes dans la plupart des cas. Il en résulte que les cellules viennent en contact avec un revêtement de protéines plutôt qu'avec la surface originelle du biomatériau. Les cellules réagissant spécifiquement aux protéines, ce revêtement pourrait être ce qui régit les réactions à la présence de l'implant. »

« Les particules inhalées parviennent dans la région alvéolaire déjà couvertes de molécules, celles préalablement adsorbées en phase gazeuse, et celles provenant du surfactant pulmonaire. Ces molécules peuvent être déplacées par des protéines, au contact des fluides extracellulaires ou du cytoplasme. Après internalisation par des macrophages alvéolaires, des enzymes protéolytiques dénudent la surface en s'attaquant aux

substances adsorbées. (...) En raison de phénomènes d'adsorption compétitive, la composition de la surface peut varier dans le temps. »

« D'une manière générale, plus la surface est hydrophobe, plus forte est l'adsorption. Le degré d'hydrophilie/hydrophobie est l'un des principaux facteurs régissant l'adsorption des protéines, spécialement en présence d'adsorption compétitive, comme c'est le cas en milieu biologique. L'adsorption sur des surfaces à forte énergie (hydrophiles) dépend fortement du pH mais ne dénature pas ou peu les protéines ; inversement, l'adsorption sur des surfaces à faible énergie est généralement supérieure d'un ordre de grandeur, implique la totalité de la surface (en l'absence de sites attracteurs spécifiques) et ne dépend pas particulièrement du pH.

La recherche de surfaces n'adsorbant pas de protéines a mené à constater qu'un greffage de type polyoxyéthylène est le plus efficace ; la nature hydrophile de ce polymère n'est toutefois pas le seul facteur impliqué, la longueur de la chaîne et sa flexibilité intervenant également. »

| Propriétés de surface et devenir de particules ultra-fines dans l'organisme

Le passage dans différents organes, le foie notamment, de PUF magnétiques d'oxyde de fer est mis à profit pour réaliser des examens par IRM (par exemple, pour le cerveau, en complément de ceux utilisant un complexe du gadolinium). De nombreux travaux montrent que ces particules sont plus ou moins phagocytées (par des fibroblastes de peau humaine) en fonction de la nature du revêtement organique appliqué et du degré de recouvrement (voir par exemple Berry et coll., 2004 ; Gupta et Curtis, 2004 ; LaConte et coll., 2005). Leur distribution et leur durée de vie dans l'organisme peuvent également être fortement influencées par la nature du revêtement (Reszka et coll., 1997 ; Moffat et coll., 2003 ; Lockman et coll., 2004 ; Gupta et Gupta, 2005a et b). Certains revêtements, notamment le « polysorbate 80 » (polyoxyéthylène sorbitol monooléate), favorisent un transfert préférentiel au cerveau (Sun et coll., 2004 ; Kreuter et coll., 2001, 2002, 2003 ; Göppert et Müller, 2005 ; voir Muller et Keck, 2004).

Malheureusement, en général pour des raisons de confidentialité, il est rarement possible de connaître les traitements ou revêtements de surface appliqués volontairement aux particules, ainsi que nombre de caractéristiques physiques de ces particules, ce qui obère fortement l'étude et la compréhension des phénomènes en jeu, et une possible adaptation des mesures de prévention, lesquelles pourraient différer selon les voies de pénétration et les organes cibles potentiels.

L'influence de la surface de la particule native a été également très étudiée du point de vue de la toxicologie (notamment pour la silice, voir Donaldson et coll., 2001 ; Hetland et coll., 2001 ; Fenoglio et coll., 2000 ; Barrett et coll., 1999 ; Fubini, 1998 ; voir chapitre 7).

Comme le conclut Borm (2004) en renvoyant sur ce point au rapport de l'ECVAM déjà cité (Fubini et coll., 1998), il faudrait, lorsque l'on étudie un type de particules ultra-fines, s'enquérir des traitements de surface appliqués et de leurs effets sur des caractéristiques comme le potentiel ζ (dzêta) ou la réactivité de surface (voir Fubini, 1997). Le rôle des charges superficielles, qui semble avoir été relativement peu étudié, est néanmoins important pour le passage ou la réaction avec la barrière hématoencéphalique (voir Lockman et coll., 2004).

Le rôle éventuel d'ions métalliques superficiels ou de la formation de radicaux libres est discuté par ailleurs (voir chapitre 7, point 1 ; chapitre 8, point 3).

4.3.3. Influence de facteurs externes

La pénétration de particules dans l'organisme, quel qu'en soit le mécanisme, peut être influencée par des facteurs extrinsèques à ces particules. Ainsi, Stone et coll. (2000) ont montré *in vitro* que la présence de particules de noir de carbone ultra-fin stimulait la pénétration de Mn extracellulaire dans la cellule « monomac 6 » (famille des macrophages). Beaucoup d'autres publications abordent ce thème, mais elles ne concernent pas particulièrement les PUF ni leur passage au cerveau.

4.3.4. Passage par d'autres voies

Le nerf trijumeau, innervant également en partie la cavité nasale, peut servir de porte de pénétration à d'autres espèces que celles du manganèse, selon un ou des mécanisme(s) analogue(s).

Hunter et Dey (1997) ont instillé dans la cavité nasale droite de rats Fisher 344, 4 μ l d'une suspension de microsphères (taille non précisée) de latex marquées à la rhodamine. Environ 1,6 % des neurones contenaient des microsphères, distribuées de façon inhomogène dans les ganglions ipsilatéraux uniquement, au niveau de la séparation des nerfs ophtalmique et maxillaire. Des coupes de la muqueuse nasale ont montré que les microsphères n'étaient présentes que dans la couche épithéliale et non dans la lamina propria ; le transport n'aurait donc lieu que par les fibres nerveuses parcourant la couche épithéliale.

D'autres voies de pénétration peuvent être imaginées. L'anatomie des voies nasales comporte en effet des connexions avec l'oreille moyenne, *via* la trompe d'Eustache, avec les muqueuses oculaires *via* le canal lacrymal, et avec la cavité buccale, *via* le rhinopharynx. On peut donc imaginer, du moins en théorie, des effets encore à découvrir au niveau de ces organes ou cavités, sous réserve que des PUF puissent atteindre (directement ou par un phénomène de transport) de telles localisations.

Conclusion

L'éventualité d'un passage de particules ultra-fines depuis les fosses nasales jusqu'au cerveau doit être considérée comme probable, mais dépendant de nombreux facteurs autres que la taille, tels que forme, nature chimique, propriétés de surface (aire, porosité, charge, modifications locales), degré d'agglomération, solubilité, et dose (Elder et coll., 2006). Les voies de pénétration sont de plus diverses, aussi bien nerveuses (nerf olfactif, nerf trijumeau), que paracellulaires ou cellulaires et probablement utilisées de manière qui dépend des paramètres évoqués.

Les particules sont généralement recouvertes de contaminants adsorbés, qui peuvent participer à la formation de radicaux libres et ainsi endommager des lipides, des acides nucléiques et des protéines. Or le cerveau est particulièrement sensible à l'action des espèces activées de l'oxygène en raison de ses besoins énergétiques élevés, de faibles concentrations locales d'antioxydants (comme vitamine C, catalase, ou superoxyde dismutase), et de fortes teneurs cellulaires en lipides et protéines, espèces sensibles au stress oxydant. De par leur structure, certains types de neurones sont plus particulièrement sensibles, notamment les neurones dopaminergiques (atteints dans la maladie de Parkinson) et les neurones cholinergiques (atteints dans la maladie d'Alzheimer). Ceci pourrait prendre une grande importance dans le contexte d'expositions urbaines marquées conjuguées avec la tendance au vieillissement de la population dans diverses grandes villes.

Les fosses nasales sont également en relation avec d'autres organes ou systèmes, comme l'oreille moyenne ou le canal lacrymal, mais aucune publication n'en a pour le moment recherché les conséquences potentielles.

Bibliographie

- Arvidson B (1994). A review of axonal transport of metals. *Toxicology* **88(1-3)** 1-14.
- Aschner M, Shanker G, Erikson K, Yang J, Mutkus LA (2002). The uptake of manganese in brain endothelial cultures. *Neurotoxicology* **23(2)** 165-168.
- Barrett EG, Johnston C, Oberdörster G, Finkelstein JN (1999). Silica binds serum proteins resulting in a shift of the dose-response for silica-induced chemokine expression in an alveolar type II cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* **161(2)** 111-122.
- Bench G, Carlsen TM, Grant PG, Wollett JS Jr, Martinelli RE, Lewis JL, Divine KK (2001). Olfactory bulb uptake and determination of biotransfer factors in the California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) exposed to manganese and cadmium in environmental habitats. *Environ Sci Technol* **35(2)** 270-277.
- Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis AS (2004). Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials* **25(23)** 5405-5413.

- Block ML, Wu X, Pei Z, Li G, Wang T, Qin L, Wilson B, Yang J, Hong JS, Veronesi B (2004). Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB J* **18(13)** 1618-1620.
- Borm PJA (2004). Toxicology of ultrafine particles, in BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces", BIA-Report 7/2003e, pp. 41-58.
- Borm P, Klaessig FC, Landry TD, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K, Trottier R, Wood S (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: Role of Dissolution in Biological Fate and Effects of Nanoscale Particles. *Toxicol Sci.* **90(1)** 22-32.
- Brooking J, Davis SS, Illum L (2001). Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *J Drug Target* **9(4)** 267-279.
- Calderón-Garcidueñas L, Valencia-Salazar G, Rodríguez-Alcaraz A, Gambling TM, García R, Osnaya N, Villarreal-Calderon A, Devlin RB, Carson JL (2001). Ultrastructural nasal pathology in children chronically and sequentially exposed to air pollutants. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24(2)** 132-8.
- Calderón-Garcidueñas L, Maronpot RR, Torres-Jardon R, Henriquez-Roldan C, Schoonhoven R, Acuna-Ayala H, Villarreal- Calderón A, Nakamura J, Fernando R, Reed W, Azzarelli B, Swenberg JA (2003). DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicol Pathol* **31(5)** 524-538.
- Calderón-Garcidueñas L, Reed W, Maronpot RR, Henriquez-Roldan C, Delgado-Chavez R, Calderón-Garcidueñas A, Dragustinovis I, Franco-Lira M, Aragon-Flores M, Solt AC, Altenburg M, Torres-Jardon R, Swenberg JA (2004). Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol* **32(6)** 650-658.
- Chang CY, Chien HF, Jiangshieh YF, Wu CH (2003). Microglia in the olfactory bulb of rats during postnatal development and olfactory nerve injury with zinc sulfate: a lectin labeling and ultrastructural study. *Neurosci Res* **45(3)** 325-333.
- Childers MA (2004). Popular cold remedy has unexpected side effects. www.cbs2chicago.com
- Cleary PP, Zhang Y, Park HS (2004). Nasal associated lymphoid tissue & M cells, a window to persistent streptococcal infections. *Ind J Med Res* **119 (Suppl)** 57-60.
- Donaldson K, Stone V, Duffin R, Clouter A, Schins R, Borm P (2001). The quartz hazard: effects of surface and matrix on inflammogenic activity. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **20 (Suppl. 1)** 109-18.
- Dorman DC, McManus BE, Parkinson CU, Manuel CA, McElveen AM, Everitt JI (2004). Nasal toxicity of manganese sulfate and manganese phosphate in young male rats following subchronic (13-week) inhalation exposure. *Inhal Toxicol* **16(6-7)** 481-488.
- Dorman DC; Brenneman KA; McElveen AM; Lynch SE; Roberts KC; Wong BA (2002a). Olfactory transport: a direct route of delivery of inhaled manganese phosphate to the rat brain. *J Toxicol Environ Health Part A*, **65(20)** 1493-1511.
- Dorman DC, Struve MF, Wong BA (2002b). Brain manganese concentrations in rats following manganese tetroxide inhalation are unaffected by dietary manganese intake. *Neurotoxicology* **23(2)** 185-95.
- Dorman DC, Struve MF, James RA, Marshall MW, Parkinson CU, Wong BA (2001). Influence of particle solubility on the delivery of inhaled manganese to the rat brain: manganese sulfate and manganese tetroxide pharmacokinetics following repeated (14-day) exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* **170(2)** 79-87.

- Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G (2006). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.* **114**(8) 1172-1178.
- Eyles JE, Bramwell VW, Williamson ED, Alpar HO (2001a). Microsphere translocation and immuno-potential in systemic tissues following intranasal administration. *Vaccine* **19**(32) 4732-4742.
- Eyles JE, Spiers ID, Williamson ED, Alpar HO (2001b). Tissue distribution of radioactivity following intranasal administration of radioactive microspheres. *J Pharm Pharmacol* **53**(5) 601-607.
- Feikert T, Mercer P, Corson N, Gelein R, Opanashuk L, Elder A, Silva V, Carter J, Maynard A, Finkelstein J, Oberdörster G (2004). Inhaled solid ultrafine particles (UFP) are efficiently translocated via neuronal nasoolfactory pathways. *The Toxicologist* **78**(S-1), summary n° 2113 (page 435).
- Fenoglio I, Fubini B, Tiozzo R, Di Renzo F (2000). Effect of micromorphology and surface reactivity of several unusual forms of crystalline silica on the toxicity to a monocyte macrophage tumor cell line. *Inhal Toxicol* **12** (Suppl. 3) 81-89.
- Feron VJ, Arts JH, Kuper CF, Slootweg PJ, Woutersen RA (2001). Health risks associated with inhaled toxicants. *Crit Rev Toxicol* **31**(3) 313-347.
- Fubini B (1997). Surface Reactivity in the Pathogenic Response to Particulates. *Environ Health Perspect* **105** (Suppl. 5) 1013-1020.
- Fubini B (1998). Health effects of silica. In: *The surface properties of silicas*, edited by AP Legrand, John Wiley & sons Ltd, pp. 415-464.
- Fubini B, Aust AE, Bolton RE, Borm PJA, Bruch J, Ciapetti G, Donaldson K, Elias Z, Gold J, Jaurand MC, Kane AB, Lison D, Muhle H (1998). Non-animal Tests for Evaluating the Toxicity of Solid Xenobiotics. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 30. ATLA-alternatives to laboratory animals 26 (<http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM30.htm>).
- Göppert TM, Müller RH (2005). Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: Comparison of plasma protein adsorption patterns. *J Drug Target* **13**(3) 179 – 187.
- Gupta AK, Curtis AS (2004). Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials* **25**(15) 3029-3040.
- Gupta AK, Gupta M (2005a). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**(18) 3995-4021.
- Gupta AK, Gupta M (2005b). Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **26**(13) 1565-1573.
- Hetland RB, Schwarze PE, Johansen BV, Myran T, Uthus N, Refsnes M (2001). Silica-induced cytokine release from A549 cells: importance of surface area versus size. *Hum Exp Toxicol* **20**(1) 46-55.
- Hunter DD, Dey RD (1997). Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat nasal epithelium. *Neurosci* **83**(2) 591-599.
- Illum L (2000). Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Europ J Pharmaceut Sci* **11**, 1-18.

- Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee JK, Cho MH (2006). Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol Sci* **89**(1) 338-347.
- Kraehenbuhl JP, Neutra MR (2000). Epithelial M Cells: differentiation and Function. *Annual Rev Cell Develop Biol* **16**, 301-332
- Kreuter J (2001). Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* **47**(1) 65-81.
- Kreuter J, Ramge P, Petrov V, Hamm S, Gelperina SE, Engelhardt B, Alyautdin R, von Briesen H, Begley DJ (2003). Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm Res* **20**(3) 409-416.
- Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ramge P, Cychutek K, Koch-Brandt C, Alyautdin R (2002). Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target* **10**(4) 317-325.
- LaConte L, Nitin N, Bao G (2005). Magnetic nanoparticle probes. *Materials today* **8**(5) (Suppl. 1), 32-38.
- Lewis J, Bench G, Myers O, Tinner B, Staines W, Barr E, Divine KK, Barrington W, Karlsson J (2005). Trigeminal uptake and clearance of inhaled manganese chloride in rats and mice. *Neurotoxicology* **26**(1) 113-123.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* **111**(4) 455-460.
- Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD (2004). Nanoparticle Surface Charges Alter Blood-Brain Barrier Integrity and Permeability. *J Drug Target* **12**(9-10) 635-641.
- Matsukawa Y, Lee VH, Crandall ED, Kim KJ (1997). Size-dependent dextran transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J Pharm Sci* **86**(3) 305-309.
- Moffat BA, Reddy GR, McConville P, Hall DE, Chenevert TL, Kopelman RR, Philbert M, Weisleder R, Rehemtulla A, Ross BD (2003). A novel polyacrylamide magnetic nanoparticle contrast agent for molecular imaging using MRI. *Mol Imaging* **2**(4) 324-332.
- Muller RH, Keck CM (2004). Drug delivery to the brain--realization by novel drug carriers. *J Nanosci Nanotechnol* **4**(5) 471-483.
- Normandin L, Ann Beaupre L, Salehi F, St -Pierre A, Kennedy G, Mergler D, Butterworth RF, Philippe S, Zayed J (2004). Manganese distribution in the brain and neurobehavioral changes following inhalation exposure of rats to three chemical forms of manganese. *Neurotoxicology* **25**(3) 433-441.
- Oberdörster G (1992). Pulmonary deposition, clearance and effects of inhaled soluble and insoluble cadmium compounds. *IARC Sci Publ* **118**, 189-204.
- Oberdörster E (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect* **112**(10) 1058-1062.
- Oberdörster G (2004). Distribution of ultrafine aerosols in the organism. In: BIA-Workshop *Ultrafine aerosols at workplaces*, BIA-Report 7/2003e, pp. 25-38.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* **65**(20) 1531-1543.

- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004). Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhal Toxicol* **16(6-7)** 437-445.
- Oberdörster G, Utell M (2002). Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract-and beyond? *Environ Health Perspect* (editorial) **110(8)** A440-A441.
- Ohtake K, Natsume H, Ueda H, Morimoto Y (2002). Analysis of transient and reversible effects of poly-L-arginine on the *in vivo* nasal absorption of FITC-dextran in rats. *J Control Release* **82(2-3)** 263-275. Erratum in: *J Control Release* 2003 Mar 26, **88(3)** 445-447.
- Persson E, Henriksson J, Tallkvist J, Rouleau C, Tjälve H (2003). Transport and subcellular distribution of intranasally administered zinc in the olfactory system of rats and pikes. *Toxicology* **191(2-3)** 97-108.
- Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M, Reed W, Rothen-Rutishauser B, Schürch S, Schulz H (2006). Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part Fibre Toxicol* **3**, 13.
- Rao DB, Wong BA, McManus BE, McElveen AM, James AR, Dorman DC (2003). Inhaled iron, unlike manganese, is not transported to the rat brain *via* the olfactory pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* **193(1)** 116-126.
- Reszka R, Beck P, Fichtner I, Hentschel M, Richter J, Kreuter J (1997). Body Distribution of Free, Liposomal and Nanoparticle-Associated Mitoxantrone in B16-Melanoma-Bearing Mice. *Pharmacol Exper Ther* **280(1)** 232-237.
- Roels H, Meiers G, Delos M, Ortega I, Lauwerys R, Buchet JP, Lison D (1997). Influence of the route of administration and the chemical form ($MnCl_2$, MnO_2) on the absorption and cerebral distribution of manganese in rats. *Arch Toxicol* **71(4)** 223-230.
- Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G, Kreyling WG (2004). Long-Term Clearance Kinetics of Inhaled Ultrafine Insoluble Iridium Particles from the Rat Lung, Including Transient Translocation into Secondary Organs. *Inhal Toxicol* **16(6-7)** 453-459.
- Shwe TTW, Yamamoto S, Ahmed S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H (2006). Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol-Lett* **163(2)** 153-160.
- Stone V, Tuinman M, Vamvakopoulos JE, Shaw J, Brown D, Petterson S, Faux SP, Borm P, MacNee W, Michaelangeli F, Donaldson K (2000). Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur Respir J* **15(2)** 297-303.
- Sun W, Xie C, Wang H, Hu Y (2004). Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials* **25(15)** 3065-3071.
- Sunderman FW Jr. (2001). Nasal Toxicity, Carcinogenicity, and Olfactory Uptake of Metals. *Annals of Clin Lab Sci* **31**, 3-24.
- Tallkvist J, Persson E, Henriksson J, Tjälve H (2002). Cadmium-metallothionein interactions in the olfactory pathways of rats and pikes. *Toxicol Sci* **67(1)** 108-113.
- Tjälve H, Henriksson J (1999). Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicol* **20(2-3)** 181-195.
- Velin D, Fotopoulos G, Luthi F, Kraehenbuhl JP (1997). The Nasal-associated Lymphoid Tissue of Adult Mice Acts as an Entry Site for the Mouse Mammary Tumor Retrovirus. *J Exp Med* **185(10)** 1871-1876.
- Veronesi B, Makwana O, Pooler M, Chi Chen L (2005). VII. Degeneration of Dopaminergic Neurons in Apo E^{-/-} Mice. *Inhal Toxicol* **17(4-5)** 235-241.

- Vila A, Sanchez A, Evora C, Soriano I, Vila Jato JL, Alonso MJ (2004). PEG-PLA nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *J Aerosol Med* **17(2)** 174-185.
- Vitarella D, Moss O, Dorman DC (2000). Pulmonary clearance of manganese phosphate, manganese sulfate, and manganese tetraoxide by CD rats following intratracheal instillation. *Inhal Toxicol* **12(10)** 941-957.
- Yang CS, Chang CH, Tsai PJ, Chen WY, Tseng FG, Lo LW (2004). Nanoparticle-based *in vivo* investigation on blood-brain barrier permeability following ischemia and reperfusion. *Anal Chem* **76(15)** 4465-4471.
- Yokel RA, Crossgrove JS (2004). Manganese toxicokinetics at the blood-brain barrier. Health Effects Institute Research Report N° 119, January 2004.
- Yu IJ, Park JD, Park ES, Song KS, Han KT, Han JH, Chung YH, Choi BS, Chung KH, Cho MH (2003). Manganese distribution in brains of Sprague-Dawley rats after 60 days of stainless steel welding-fume exposure. *Neurotoxicology* **24(6)** 777-785.

Données de toxicologie issues de l'environnement

4

1. Études expérimentales (domaine de l'environnement)

G. Lacroix

Introduction

De tout temps, l'homme a été exposé aux particules ultrafines (PUF), qu'elles soient d'origine naturelle (éruptions volcaniques, feux de forêt, tempêtes de sable...) ou liées aux activités humaines (combustion des énergies fossiles pour le chauffage, la cuisine, le transport, activités de concassage et de broyage des roches et minerais, activités de soudure...). Cette exposition n'est devenue significative qu'après la révolution industrielle, à la fin du XIX^e siècle, mais ce n'est que depuis une quinzaine d'années que le rôle potentiel des PUF, dans la toxicité liée à l'inhalation de poussières, est étudié de façon extensive. Ainsi, si l'on recherche l'expression *ultrafine particles* dans une base de données type *PubMed*, les premières références bibliographiques significatives en nombre datent de 1990.

Les études épidémiologiques ont permis d'établir une relation entre la pollution atmosphérique particulaire, notamment la fraction fine et ultrafine, et les pathologies cardio-respiratoires de populations sensibles (personnes âgées ou malades, voir le point 2, ci-après). En parallèle, les études expérimentales, réalisées chez l'animal de laboratoire,

ont confirmé le caractère toxique des particules ambiantes et ont analysé les mécanismes d'action, les paramètres responsables de la toxicité (taille, composition par exemple) et la relation dose-effet.

Ce chapitre ne traite que des études expérimentales, l'objectif étant de décrire les effets des PUF d'origine environnementale, sans chercher à étudier les paramètres physicochimiques importants pour la toxicité, aspects traités dans les chapitres 7 et 8.

Comme indiqué plus haut, les sources prépondérantes des PUF environnementales sont d'origine anthropique, liées essentiellement aux processus de combustion. Un exemple bien connu de particules ultra-fines sont les particules diesels, objet d'un examen séparé dans cet ouvrage (voir chapitre 6, point 2). Les PUF qui, contrairement aux nanomatériaux manufacturés, sont produites non intentionnellement, se caractérisent par une nature physicochimique très variable (organique ou minérale, soluble ou insoluble, volatile ou non...). Elles se présentent souvent sous forme d'agrégats en forme de chaînes ou d'amas compacts dans lesquels des particules individualisées peuvent être identifiées (figure 4.1).

Les particules ultra-fines environnementales constituent, en nombre, l'essentiel de la pollution atmosphérique particulaire. Elles ne contribuent en revanche que très peu à la masse globale des poussières ambiantes, ce qui explique, au moins en partie, pourquoi elles n'ont été considérées que tardivement.

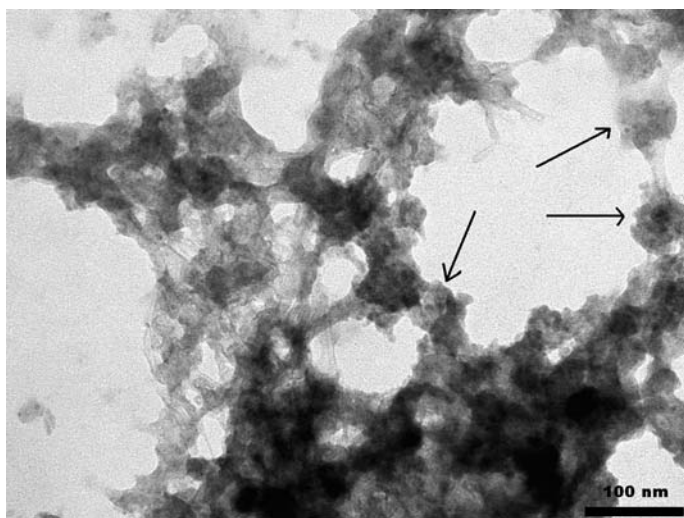


Figure 4.1. Particules collectées en hiver sur filtre dans le centre ville de Bobigny (microscopie électronique à transmission). Flèches : particules individualisées (Cliché INERIS, O. Aguerre-Chariol, P. Delalain, Direction des Risques Chroniques, Unité CHEN).

Avant de décrire les effets sur la santé liés aux PUF environnementales, il est apparu utile de présenter de façon synthétique les effets de la pollution particulaire globale, qui comprend des particules de tailles très variables, allant des plus grossières (10 μm) aux ultra-fines (< 0,1 μm). Cela permettra de comprendre pourquoi l'hypothèse d'un rôle important des ultra-fines dans la toxicité atmosphérique particulaire a été émise vers le milieu des années 1990, et de mettre en valeur les spécificités toxicologiques des PUF.

1.1. Toxicologie de la pollution atmosphérique particulaire globale (PM₁₀ et PM_{2,5})

Traditionnellement, et encore maintenant, la métrique utilisée pour quantifier la pollution atmosphérique particulaire est la masse, notamment au niveau des valeurs de référence pour la qualité de l'air ou des normes à l'émission des véhicules.

La pollution atmosphérique particulaire est appelée conventionnellement PM₁₀ ou PM_{2,5}, en référence à la méthode d'échantillonnage utilisée, qui mesure la masse des particules collectées avec une efficacité de 50 % pour les particules d'un diamètre aérodynamique moyen de 10 ou 2,5 μm . En simplifiant, on peut dire que les PM₁₀ (PM_{2,5}) représentent la fraction contenant des particules d'un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 10 (2,5) μm . Les PM₁₀ sont encore appelées fraction grossière (« *coarse fraction* ») et les PM_{2,5} fraction fine, sachant que dans les deux cas, les PUF se retrouvent échantillonnées également. Ces dernières représentent par convention les particules de taille < 0,1 μm , appelées parfois PM_{0,1}.

La majorité des travaux de recherche ont porté sur les PM₁₀ et les PM_{2,5}. Les particules sont soit collectées sur filtre et remises en suspension dans un liquide physiologique avant d'être administrées par instillation intratrachéale, soit les animaux sont exposés par inhalation. Dans ce dernier cas, les travaux portent souvent sur des fractions concentrées (en anglais CAPs, pour *Concentrated Ambient Particles*). Le plus souvent, la technologie employée permet d'augmenter en temps réel la masse de particules fines (entre 0,1 et 2,5 μm) de l'aérosol, sans modifier leurs caractéristiques physicochimiques. La fraction gazeuse ainsi que les particules grossières et ultra-fines ne sont pas concentrées (Ghio et Huang, 2004). Les effets spécifiques des particules fines peuvent être ainsi étudiés chez l'homme ou l'animal, dans des conditions représentatives des conditions environnementales (expositions par inhalation à des particules ambiantes), mais sous une forme plus concentrée, ce qui permettrait en théorie une mise en évidence plus facile d'éventuels effets sur la santé, à moins que l'interaction entre les particules et les gaz ne joue un rôle prépondérant dans l'induction des effets biologiques (Cassee et coll., 2005). Certains appareils peuvent maintenant également concentrer la fraction ultra-fine.

Encadré 4.1

Notion de surcharge pulmonaire en particules

Avant de décrire les effets liés à l'exposition à la pollution particulaire, il faut souligner que dans la majorité des études, les animaux sont exposés à des niveaux de l'ordre de 10 à 100 fois la concentration massique journalière ambiante. Depuis 1997, par exemple, les niveaux moyens en PM₁₀ en région parisienne sont de l'ordre de 20 à 30 µg/m³ (voir <http://www.airparif.asso.fr/pages?article=evolution&rubrique=polluants>). Un rat inspirant environ 100 ml/min inhale approximativement 1,5 m³ d'air en 24 heures (Tao et coll., 2003), soit 15 à 23 µg de particules, en supposant que 50 % des particules inhalées se déposent dans les poumons. Dans certains cas, des rats ont été exposés en une seule fois à 1-5 mg de particules par instillation, et il convient donc d'être prudent si l'on souhaite extrapoler les effets aux doses ambiantes. À titre comparatif, le dépôt journalier de PM₁₀ dans les poumons chez l'homme est de l'ordre de 250 µg dans les pays industrialisés (Pooley et Mille, 1999).

Il faut ici évoquer le phénomène de surcharge pulmonaire (*lung particle overload*) ; ce dernier a été mis en évidence expérimentalement, chez les rats exposés chroniquement à des concentrations importantes (1-30 mg/m³) de particules insolubles de faible toxicité (Oberdörster, 1995). La fonction de clairance des macrophages alvéolaires ne se fait plus correctement en raison de l'accumulation importante de particules dans les poumons, ce qui entraîne des doses intrapulmonaires de plus en plus élevées, une inflammation, une prolifération, une fibrose, voire des tumeurs pulmonaires (Oberdörster, 1995). Pour des particules insolubles de faible toxicité, ce phénomène se produit dès que le poumon de rat contient 1-3 mg de particules (Oberdörster, 1995). Il a été montré que ce phénomène de surcharge était en relation avec l'aire des particules insolubles (Donaldson et coll., 2001). Les particules ultra-fines, ayant une aire spécifique très importante, sont susceptibles d'induire ce phénomène de surcharge à de plus faibles doses (Donaldson et coll., 2001). L'utilisation de doses fortes est souvent nécessaire en pathologie expérimentale, pour obtenir une réponse mesurable, prérequis pour évaluer un effet (Donaldson et coll., 2002). Dans le domaine des particules, il faut toutefois être conscient de l'existence de ce phénomène de surcharge, qui peut entraîner des effets peu représentatifs de la réalité.

1.1.1. Effets pulmonaires

| Inflammation et stress oxydant

De nombreuses études chez l'animal sain ont montré que l'exposition par instillation ou inhalation aux particules atmosphériques induisait un stress oxydant et une inflammation pulmonaire, caractérisée notamment par un afflux de polynucléaires neutrophiles, une augmentation des quantités de protéines dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire et une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Pour éviter une énumération fastidieuse, une partie de ces études est résumée dans le tableau 4.I ci-après.

Source PM (granulométrie)	Espèce	Dose ou exposition	Surcharge ¹	Effets	Référence
EHC-93 (PM ₁₀)	Rat	5 mg/rat	oui	↑ cellules (LBA)	Adamson et coll., 2003
EHC-93 (PM ₁₀)	Souris	1 mg/souris	oui	↑ macrophages et neutrophiles (LBA) ↑ protéines (LLBA) ↑ prolifération cellulaire	Prieditis et Adamson, 2002
Utah (PM _{2,5})	Souris	0,5 mg/souris	oui	↑ cellules (LBA) ↑ HRB ²	Walters et coll., 2001
Écosse (PM ₁₀)	Rat	50-125 µg/rat	non	↑ neutrophiles (LBA) ↑ TNF-α, NO, protéines (LLBA) ↓ GSH ³ (LLBA)	Li et coll., 1997
SRM1648, SRM1649, Dusseldorf, Ottawa (PM ₁₀)	Rat	2,5 mg/rat	oui	↑ neutrophiles (LBA) ↑ protéines, albumine et LDH (LLBA)	Costa et Dreher, 1997
Utah Valley (composants solubles)	Rat	1-2,5 mg/rat	-	↑ neutrophiles et des cellules totales (LBA) ↑ LDH et protéines (LLBA)	Dye et coll., 2001
Allemagne (PM ₁₀)	Rat	5 mg/rat	oui	↑ cellules (LBA) ↑ HRB ²	Pritchard et coll., 1996
CAPs (PM _{2,5-0,1})	Rat	126-481 µg/m ³ (5j, 3h/j)	non	↑ neutrophiles (LBA)	Saldiva et coll., 2002
CAPs (PM _{2,5-0,1})	Rat	110-350 µg/m ³ (3h)	non	Pas d'effets pulmonaires ↑ neutrophiles, ↓ lymphocytes (sang) réversible	Gordon et coll., 1998

Tableau 4.I. Effets inflammatoires et oxydants des PM.

¹Voir encadré. ²Hyperréactivité bronchique. ³Glutathion. ⁴Superoxyde dismutase.

⁵Catalase. ⁶Glutathion peroxydase.

CAPs (PM _{2,5-0,1})	Rat	265-1200 µg/ m ³ (2-3j, 6h/j)	non/oui	Pas d'effets inflammatoires pulmonaires	Gordon et coll., 1998 Kodavanti et coll., 2000
CAPs (PM _{2,5-0,1})	Chien	300 µg/ m ³ (3j)	non	→ neutrophiles (LBA)	Clarke et coll., 2000b
CAPs (PM _{2,5-0,1})	Rat	80-170 µg/m ³ (3j, 5h/j)	non	Jeunes rats (4-6 sem) plus sensibles à l'inflammation pulmonaire que les vieux rats (> 17 mois)	Clarke et coll., 2000a
ROFA (MMAD 1,95 µm)	Souris	50 µg/souris	non	↓ réponse inflam- matoire chez les souris surexpri- mant la SOD ⁴	Ghio et coll., 2002
ROFA (PM?)	Rat	500 µg/rat	non	Formation de radicaux libres dans le poumon	Kadiiska et coll., 1997
Chine (PM _{2,5})	Rat	1,5/7,5/37,5 mg/kg	non/oui	↑ peroxidation lipidique (poumons, cœur, foie, testicules) ↓ SOD ⁴ , CAT ⁵ , GPx ⁶ (poumons, foie, rein, cerveau) ↓ GSH (poumons, cœur, foie, testicules, reins, cerveau, rate)	Liu et Meng, 2005
CAPs (PM _{2,5-0,1})	Rat	300 µg/m ³ (5h)	non	Présence d'un stress oxydant (poumons, cœur) mais pas dans le foie. Pas d'effet pour 1 et 3 h d'expo. ↑ SOD ⁴ (poumons, cœur), ↑ CAT ⁵ (poumons) Carbon black : pas d'effet ROFAs : fort stress oxydant	Gurgueira et coll., 2002

Tableau 4.1. (suite) Effets inflammatoires et oxydants des PM.

¹Voir encadré. ²Hyperréactivité bronchique. ³Glutathion. ⁴Superoxyde dismutase.

⁵Catalase. ⁶Glutathion peroxydase.

CAPs (PM _{2,5-0,1})	Rat	1 mg/m ³ (1h)	non	Effet protecteur de la N-acétylcystéine (50 mg/kg en i.p.) dans l'inflammation induite	Rhoden et coll., 2004
Caroline du Nord 20-3,5 µm (CO) 3,5-1,7 µm (FI) < 1,7 µm (FU)	Sou- ris	100 µg/ souris	?	Analyse chimique : Fe, Cu, endotoxines (CO>FI>FU) S (FU>FI>CO) Effets : ↑ neutrophiles LBA (FU>FI>CO) ↑ albumine et TNF-α LBA (FI) ↑ IL-6 LBA (CO, FI, FU) Traitement par un antioxydant (DMTU) ↓ inflammation Pas de relation toxicité / taille des fractions	Dick et coll., 2003

Tableau 4.I. (suite) Effets inflammatoires et oxydants des PM.

¹Voir encadré. ²Hyperréactivité bronchique. ³Glutathion. ⁴Superoxyde dismutase.

⁵Catalase. ⁶Glutathion peroxydase.

Différentes études *in vitro* ont confirmé le caractère inflammatoire et oxydant des particules ambiantes, en apportant un certain éclairage sur le rôle respectif des différentes fractions granulométriques dans les effets observés.

Une induction de TNF-α et d'IL-6 a été notée chez une lignée de monocytes/macrophages murins (RAW 264.7) respectivement 5 h et 24 h après contact avec la fraction grossière (PM₁₀) et fine (PM_{2,5}) de particules collectées en été à Rome. Une augmentation de la libération d'acide arachidonique a été également observée, indiquant un léger effet toxique aux doses utilisées (30 et 120 µg/ml). Les effets étaient plus marqués avec la fraction grossière, et quasi inexistantes avec du noir de carbone fin, indiquant que les contaminants présents sur la surface des particules étaient responsables de la toxicité (Pozzi et coll., 2003). À noter que la fraction grossière était plus riche en silicates (provenant de processus d'érosion) et la fraction fine plus riche en particules carbonées (issues des processus de combustion, notamment automobile). La fraction grossière contenait également 3,4 fois plus d'endotoxines que la fraction fine.

Par la suite, cette même équipe a étudié de façon similaire des échantillons collectés en hiver. La fraction fine était cette fois plus réactive que la fraction grossière, bien qu'elle contienne toujours trois fois moins d'endotoxines. Les auteurs en ont conclu

qu'une composition chimique différente pouvait expliquer ces observations contradictoires (Pozzi et coll., 2005). Les échantillons collectés en hiver contenaient en effet beaucoup plus de composés carbonés (71 % pour la fraction fine) qu'en été (61 % pour la fraction fine).

Les endotoxines ont en revanche été mises en cause, au moins partiellement, dans l'inflammation induite par des PM₁₀ (Becker et coll., 1996) et des PM_{2,5} collectées dans un environnement extérieur et à l'intérieur de locaux (Long et coll., 2001).

Ces études soulignent toutes l'hétérogénéité et la difficulté d'étudier les déterminismes de la toxicité des échantillons ambiants.

Une autre étude a montré que des macrophages, pré-exposés à des PM₁₀ collectées en Angleterre et en Écosse, pouvaient amplifier la réaction inflammatoire en induisant la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales. Cette production d'IL-8 était réduite par ajout d'un anticorps anti-TNF- α , suggérant que ce dernier est, au moins partiellement, impliqué dans ce processus (Jimenez et coll., 2002). De façon similaire, une amplification de la sécrétion de cytokines en réponse à l'exposition *in vitro* de PM₁₀ (SRM 1649, collectées à Washington) a été observée dans un modèle de co-culture macrophages-cellules épithéliales (Tao et Kobzik, 2002). Les cellules épithéliales sont par ailleurs capables d'être activées directement (augmentation du calcium intracellulaire) et de sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL-6) en présence de PM de différentes origines (Veronesi et Oortgiesen, 2001). Une réponse similaire a été observée chez les neurones des fibres sensorielles de type C, innervant l'épithélium bronchique même si la réponse est qualitativement et quantitativement différente (Veronesi et Oortgiesen, 2001).

Les propriétés oxydantes des particules environnementales et l'effet protecteur des antioxydants naturellement présents dans le surfactant pulmonaire ont été évalués *in vitro*. Des échantillons de poussières atmosphériques de fraction grossière (PM_{10-2,5}) ou fine (PM_{2,5-0,1}) ont été collectés sur un site industriel (Port Talbot) et un site urbain (Cardiff) au Pays de Galles. Tous les échantillons présentaient des propriétés oxydatives (évaluées par le test de dégradation oxydative de l'ADN *in vitro*), mais cet effet était plus marqué chez les échantillons d'origine industrielle (plus riches en fer) et, quelle que soit l'origine du prélèvement, chez la fraction la plus grossière (plus précisément sa composante soluble). Ceci va à l'encontre de l'hypothèse d'une bioréactivité plus importante des particules les plus fines. Ces effets oxydants étaient atténués en présence de surfactant (fraîchement isolé chez le rat, ou artificiel), surtout chez les échantillons les plus réactifs (poussières industrielles et fraction grossière). Les auteurs ont conclu que les échantillons d'origine urbaine et la fraction fine contiennent moins de composés oxydants que les échantillons d'origine industrielle et la fraction grossière. De plus, les antioxydants pulmonaires sont moins efficaces envers le stress oxydant induit par les PM_{2,5} qu'envers celui induit par les PM₁₀ (Greenwell et coll., 2003).

Des particules ambiantes concentrées (PM_{2,5}) ont également montré des propriétés oxydantes vis-à-vis de macrophages alvéolaires de hamsters (Goldsmith et coll., 1997). Les espèces réactives de l'oxygène ainsi formées peuvent conduire à l'induction de médiateurs pro-inflammatoires *via* l'activation de voies de signalisation calcium-dépendantes, de l'activation des protéines de la famille des kinases (MAPK) très fortement impliquées dans la transduction de signal et de facteurs de transcription sensibles au statut redox de la cellule, notamment AP-1 et NF-κB (Donaldson et coll., 2003). Cette hypothèse est soutenue par divers travaux, montrant notamment un effet *in vitro* des PM₁₀ sur les protéines MAPK, sur l'activation du facteur de transcription NF-κB et sur l'acétylation des histones, qui favorise la fixation des facteurs de transcription sur les sites promoteurs et qui est associée à la transcription d'un panel de médiateurs de l'inflammation. L'ensemble de ces études est détaillé dans une excellente revue publiée en 2003 (Donaldson et coll., 2003), à laquelle le lecteur intéressé est invité à se référer.

| Effets sur des pathologies pulmonaires préexistantes

De nombreuses pathologies pulmonaires, par exemple l'asthme, la bronchite chronique, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), sont caractérisées par une inflammation des voies aériennes. L'aggravation de ces pathologies est liée à une exacerbation de ce processus inflammatoire, qui pourrait être déclenchée par le stress oxydant et l'inflammation liés à l'exposition aux particules environnementales (Donaldson et coll., 2003). De nombreuses études épidémiologiques ont d'ailleurs montré une association entre des teneurs élevées en PM₁₀ et l'exacerbation de pathologies des voies aériennes chez des patients atteints de COPD ou d'asthme (Pope et Dockery, 1999).

Expérimentalement, l'utilisation de modèles animaux mimant des atteintes de l'appareil respiratoire a permis d'étudier l'influence de l'exposition aux particules ambiantes sur le développement et l'aggravation de la pathologie en cause.

Asthme

Une augmentation de l'hyper-réactivité bronchique, précédée par un afflux d'éosinophiles, a été notée chez des souris non sensibilisées, ayant reçu par instillation une dose de 0,5 mg de particules urbaines (diamètre moyen 1,78 µm ± 2,21 µm). Cette hyper-réactivité bronchique s'est maintenue jusqu'à 7 jours après l'instillation (Walters et coll., 2001). Une augmentation de cytokines de type 2 (IL-5, IL-13, éotaxine) a été également observée, suggérant que l'exposition à la pollution particulaire pouvait jouer un rôle dans l'augmentation de la prévalence de l'asthme.

L'effet adjuvant de particules ambiantes fines ($PM_{2,5}$) ou grossières (PM_{10}) collectées en différentes saisons dans plusieurs villes européennes (Rome, Oslo, Amsterdam et Lodz en Pologne) a été étudié dans un modèle de souris sensibilisées à l'ovalbumine (projet européen RAIAP). Les particules (3 mg/ml) ont été mélangées à l'ovalbumine (OA) et administrées par voie intranasale durant les phases de sensibilisation ou de provocation. Une inflammation pulmonaire marquée a été notée chez les souris coexposées à l'OA et aux PM. Quatre des douze échantillons testés ont induit une augmentation des taux d'IgG₁ et d'IgE sérique. Les PM collectées en hiver semblaient plus actives dans l'augmentation des taux d'IgE que les PM collectées au printemps ou en été. L'effet adjuvant était plus ou moins marqué selon les lieux de prélèvement (Lodz > Rome = Amsterdam > Oslo). Aucune différence n'a été notée entre les fractions fine et grossière, hormis pour les lésions histopathologiques (grossière > fine). Aucune association n'a été trouvée entre les effets biologiques et le contenu en endotoxines, bien que ces dernières soient surtout localisées sur la fraction grossière (Steerenberg et coll., 2004b). En conclusion, ce travail montre que les PM ambiantes peuvent présenter un effet adjuvant modulé selon leur origine géographique. Il reste à déterminer si la composition chimique peut expliquer ces différences.

Des souris, sensibilisées à l'ovalbumine, ont été exposées à $235 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $PM_{2,5}$ durant 2 semaines (3 j/sem, 4 h/j). Les expositions aux PM ont eu lieu avant, pendant ou après la sensibilisation à l'ovalbumine. L'exposition aux PM seules n'a pas induit d'effets significatifs au niveau de l'inflammation pulmonaire, de la réactivité et du contenu en collagène des voies aériennes et du pourcentage de cellules à mucus présentes dans les voies aériennes (qui reflète un processus de réparation et non une lésion). L'exposition à l'ovalbumine a induit des effets plus ou moins marqués sur ces différents paramètres. L'exposition séquentielle ou concomitante à l'ovalbumine et aux PM a induit les mêmes effets qu'avec l'ovalbumine seule, excepté pour le pourcentage de cellules à mucus, significativement augmenté par rapport à l'ovalbumine seule. À la concentration testée, l'effet des $PM_{2,5}$ était donc peu important, que les souris aient été sensibilisées ou non à l'ovalbumine (Last et coll., 2004).

Aucune aggravation des manifestations allergiques n'a été observée chez des souris sensibilisées à l'ovalbumine et exposées à des CAPs à la concentration de $395\text{-}1\,479 \mu\text{g}/\text{m}^3$ durant 3 jours (5 h/j ; Goldsmith et coll., 1999).

Bronchite chronique

Les travaux ayant porté sur des modèles animaux de bronchite chronique exposés aux particules atmosphériques (CAPs notamment) ne démontrent pas clairement que l'exposition aiguë à la fraction fine de la pollution atmosphérique aggrave ce type de pathologie.

Dans un modèle de bronchite chronique induite par le SO_2 chez le rat, les réponses pulmonaires aux CAPs (inflammation, lésion tissulaire) paraissaient peu, voire pas du

tout, exacerbées par rapport aux animaux ayant inhalé des CAPs sans être traités au SO₂ (Kodavanti et coll., 2000 ; Saldiva et coll., 2002). Une grande variabilité a été par ailleurs observée entre des études répétées à des saisons différentes, ce qui souligne les évolutions qualitatives de l'aérosol particulaire au cours du temps (Kodavanti et coll., 2000).

Aucun effet n'a également été noté chez des chiens rendus bronchitiques par inhalation de SO₂ et ayant inhalé des CAPs (Green et Armstrong, 2003).

L'exposition aux CAPs durant 3 jours (126-481 µg/m³) induit une vasoconstriction des petites artères, chez les animaux bronchitiques comme chez les animaux sains (Batalha et coll., 2002).

| Résistance aux infections

Des rats et des souris ayant reçu une instillation unique de particules ambiantes d'origines variées (5 mg/rat et 100 µg/souris), puis infectés avec un aérosol bactérien, présentaient une mortalité plus précoce et plus importante que les animaux non exposés aux particules (Hatch et coll., 1985 ; Pritchard et coll., 1996). Chez les rats, où des doses très importantes ont été utilisées, il est possible que le fort taux de mortalité soit lié à une altération importante de la clairance alvéolaire (surcharge pulmonaire), les macrophages n'étant plus capables de phagocyter les bactéries après avoir ingéré les particules. Chez les souris en revanche, les doses étaient relativement moins élevées et une exposition préliminaire à des particules inertes telles que des billes de latex, n'a pas entraîné de mortalité par infection bactérienne (Hatch et coll., 1985). On peut présumer dans ce cas que l'effet observé est spécifiquement associé aux particules ambiantes et non à une surcharge pulmonaire.

À l'inverse, aucune altération de la résistance à l'infection par *Listeria monocytogenes* n'a été observée chez des rats ayant reçu 50 µg de PM₁₀ (EHC-93) par voie intranasale durant 7 jours (Steerenberg et coll., 2004a).

Les effets des CAPs sur la résistance pulmonaire aux infections bactérienne ont été étudiés chez le rat âgé (7 à 8 mois) par deux séries d'expériences. Dans la première, des rats non infectés ont été exposés durant 3 h à une moyenne de 345 µg/m³ de particules, puis une partie a été sacrifiée pour évaluer divers marqueurs d'inflammation et de dommages tissulaires. L'autre partie des animaux a été instillée entre 4 et 120 h après l'exposition avec une suspension bactérienne, puis sacrifiée entre 4 et 72 h après. Dans la seconde série d'expérimentations, les rats ont d'abord été infectés puis exposés 48 h après à des CAPs (65-150 µg/m³) ou de l'air filtré durant 5 heures. Les animaux ont ensuite été sacrifiés entre 9 h et 120 h après l'exposition. Les résultats montrent qu'une exposition unique d'animaux sains aux CAPs n'a que peu d'effets sur la fonction immune pulmonaire ou la clairance d'un aérosol bactérien administré

postérieurement à l'exposition. En revanche, les animaux pré-infectés présentaient des charges en bactéries supérieures et une diminution des neutrophiles et des cytokines pro-inflammatoires dans le LBA, comparés aux animaux infectés exposés à l'air (Zelikoff et coll., 2003).

Plusieurs études *in vitro* ont montré une altération des fonctions de défense des macrophages alvéolaires après exposition aux PM.

L'exposition de macrophages alvéolaires issus de rats jeunes ou âgés (22-24 mois), de souche Wistar ou Fisher, à la fraction grossière ou fine de PM collectées en Hollande, a entraîné une diminution dose dépendante de la production du radical superoxyde par ces cellules. Cet effet était plus marqué pour la fraction grossière et ne semblait pas en relation avec la présence d'endotoxines ou de fer biodisponible. Aucune différence significative n'a été observée en fonction de l'âge ou de la souche de rat (Kleinman et coll., 2003).

La fonction de cellule présentatrice d'antigène de macrophages alvéolaires a été modifiée après exposition à des PM_{2,5} collectées à Houston, résultant en une production accrue de cytokines par les lymphocytes T (Hamilton et coll., 2004).

En présence de cellules épithéliales infectées par le virus respiratoire syncytial (RSV), les macrophages alvéolaires sécrètent un panel de cytokines (IL-8, MIP-1 α , β , MCP-1). L'exposition préalable de macrophages à des PM₁₀ (EHC-93) a entraîné une forte diminution de la sécrétion de cytokines et une diminution de l'activité antivirale macrophagique (Becker et Soukup, 1999).

L'altération des défenses immunitaires pulmonaires par les PM ambiantes peut être à l'origine d'une augmentation des cas d'infection pulmonaire des personnes sensibles (personnes âgées ou à pathologie pré-existante) aux épisodes de pollution atmosphérique.

1.1.2. Effets extrapulmonaires

Chez l'homme, le lien entre effets cardiovasculaires et augmentation en PM ambiantes est bien documenté sur le plan épidémiologique (voir chapitre 4, point 2). De nombreuses études réalisées chez l'animal sain ou souffrant d'une pathologie cardiaque ont permis d'apporter des éléments complémentaires pour une meilleure compréhension des déterminants et des mécanismes d'actions des particules atmosphériques.

L'exposition de rats sains à 50 ou 100 μ g de PM_{2,5} collectées à Sao Paulo n'a pas induit de modification de la fréquence cardiaque 30 et 60 minutes après instillation. En revanche, une variabilité du rythme cardiaque a été observée après 60 minutes (Rodriguez Ferreira Rivero et coll., 2005). Le protocole expérimental ne permettait pas de suivre l'évolution de cette modification et donc d'étudier son éventuelle réversibilité.

Des modifications du rythme cardiaque avaient précédemment été notées chez des rats souffrant d'un infarctus du myocarde et exposés durant 1 heure à un aérosol de ROFA, à la concentration de 3 mg/m³ (Wellenius et coll., 2002) et chez des rats hypertendus et exposés par instillation à 0-8 mg/kg de particules dérivées de la combustion d'huile (HP-12), contenant beaucoup moins de métaux que les classiques ROFA (Wichers et coll., 2004).

Des lésions histologiques (inflammation et dégénérescence) ont été observées chez des rats de souche Wistar-Kyoto normotendus, exposés par inhalation à 10 mg/m³ de particules issues de la combustion d'huiles durant 16 semaines (1 j/sem, 6 h/j). Cette souche de rat présente la particularité de tendre à développer spontanément une cardiomyopathie hypertrophique. Cet effet n'a pas été observé chez des rats de souche Sprague-Dawley (Kodavanti et coll., 2003). Cet effet des particules semble donc plutôt concerner les souches sensibles aux pathologies cardiovasculaires, rejoignant ainsi les conclusions des études épidémiologiques, qui montrent que l'effet des particules sur les populations en bonne santé est limité.

Des chiens présentant une occlusion de l'artère coronaire induite expérimentalement, et exposés durant 3-4 jours (6 h/j) à 161-957 µg/m³ de CAPs, ont présenté un taux d'ischémie supérieur aux animaux témoins. Ce résultat était corrélé à la teneur en silice des particules (Wellenius et coll., 2003). Aucune association n'a été trouvée avec la métrique masse ou nombre de particules, ce qui suggère un effet prédominant de la nature de la particule par rapport à sa taille. Le rythme cardiaque n'a pas été affecté (Wellenius et coll., 2003).

Des rats, traités à la monocrotaline pour mimer l'hypertension pulmonaire humaine, n'ont pas présenté de modifications de leur formule sanguine ni d'inflammation pulmonaire après inhalation de CAP durant 3 heures, excepté à la dose de 360 µg/m³, où certains marqueurs de l'inflammation ont augmenté dans le LBA (protéines, taux de LDH et nombre de cellules totales ; Gordon et coll., 1998). Une série d'études a été menée en Hollande chez des rats hypertendus spontanément ou préexposés à l'ozone (pour induire une inflammation légère) et exposés durant une journée à des CAP de diverses origines (zones résidentielle, industrielle ou autoroutière) à des concentrations allant jusqu'à 3 720 µg/m³. Globalement, l'exposition aux CAP induit une inflammation légère chez les rats hypertendus (augmentation de nombre de neutrophiles) et une augmentation de la perméabilité membranaire chez les animaux préexposés à l'ozone. De plus, une augmentation des concentrations en fibrinogène sanguin a été détectée chez les rats hypertendus. Ces différents effets ne sont cependant que peu corrélés à la masse des particules, ce paramètre ne paraissant pas le plus approprié pour évaluer la toxicité des CAP (Cassee et coll., 2005). Une observation similaire a été notée après une série d'expériences menées aux États-Unis chez des rats normo- et hypertendus. Les effets observés semblent plus en relation avec la composition chimique des CAP et dépendent également de la souche de rat utilisée (Kodavanti et coll., 2005).

Conclusion

Les observations effectuées au cours des études expérimentales sur les PM_{10} et les $PM_{2,5}$ indiquent que la toxicité des particules serait liée à leur capacité à provoquer un stress oxydant. Ce dernier induirait différentes voies de signalisation intracellulaire, conduisant à l'activation de facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans divers processus cellulaires tels que la croissance, l'apoptose, l'inflammation et la réponse au stress (Dreher, 2000).

Les effets liés à l'exposition aiguë à des particules atmosphériques ambiantes, que ce soit par instillation intratrachéale ou par inhalation, sont souvent de faible intensité et réversibles. Une grande variabilité est également souvent notée dans les réponses biologiques induites, ce qui reflète l'extrême complexité et l'évolution constante de l'aérosol particulaire environnemental. Les études ayant porté sur des animaux âgés ou présentant une pathologie pulmonaire ou cardiovasculaire préexistante ont permis, dans certains cas seulement, de montrer un effet plus important des particules, alors que ce lien est beaucoup mieux documenté au niveau épidémiologique. Il faut toutefois souligner que les modèles animaux ne reflètent qu'imparfaitement les pathologies humaines.

1.2. Fraction ultra-fine de la pollution particulaire

1.2.1. Importance potentielle du rôle des PUFs dans la toxicité de l'aérosol particulaire urbain. Apport des particules de substitution

Il est assez délicat d'isoler, surtout en quantité suffisante pour les divers travaux expérimentaux, la fraction ultra-fine de la pollution atmosphérique ambiante. Par ailleurs, d'un point de vue qualitatif, la pollution atmosphérique particulaire est trop complexe et variable pour étudier de façon rigoureuse sa fraction ultra-fine (Donaldson et coll., 2002). Beaucoup de travaux ont donc porté sur des particules de substitution, certes peu représentatives de la pollution particulaire ambiante, mais permettant d'étudier spécifiquement l'influence de la taille dans la toxicité de l'aérosol solide urbain.

Diverses études utilisant des particules insolubles telles que le dioxyde de titane (TiO_2), le noir de carbone ou le cobalt, ont montré que, pour une exposition à une masse donnée de particules, les particules ultra-fines (14-21 nm) induisaient des lésions pulmonaires plus sévères et persistantes que les particules fines (250-320 nm ; Li et coll., 1999 ; Oberdörster et coll., 1994 ; Osier et Oberdörster, 1997 ; Zhang et coll., 2000).

Ceci s'expliquerait par une surface spécifique plus grande chez les particules les plus fines (Salvi et Holgate, 1999). En effet, des effets toxiques plus importants ont été observés pour des particules de surface élevée, comparativement à des particules de composition similaire mais présentant une surface plus petite (Brown et coll., 2001 ; Höhr et coll., 2002 ; Lison et coll., 1997).

Plus les particules sont de faible taille, plus leur surface spécifique, pour une masse donnée, augmente et donc également leur capacité à transporter des substances toxiques et des radicaux libres (Salvi et Holgate, 1999). Ainsi, un nombre plus important de radicaux libres a été détecté dans des échantillons de PUF comparativement à des échantillons plus grossiers des mêmes poussières (Donaldson et coll., 1998 ; Zhang et coll., 1998).

Le stress cellulaire oxydant qui en résulte est à l'origine d'une inflammation locale et peut altérer la phagocytose des macrophages, augmentant de ce fait les interactions entre épithélium et PUF. Cela conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et à un transfert des particules dans l'interstitium pulmonaire (Donaldson et coll., 2001).

Ces résultats soulignent donc que les propriétés de surface des particules insolubles modulent leur activité biologique. À la lumière de cette observation, les PUF, qui présentent par nature une surface spécifique élevée, sont susceptibles de contribuer fortement à la toxicité de l'aérosol urbain, bien qu'elles ne contribuent que très peu à sa masse totale. Cette hypothèse, développée dans le courant des années 1990 par G. Oberdörster (Oberdörster et Utell, 2002) a conduit à un très fort intérêt pour l'étude de ces particules, et notamment de la fraction ultra-fine de la pollution atmosphérique.

1.2.2. Études portant sur différentes fractions granulométriques, dont UF, de la pollution atmosphérique particulaire

En raison des contraintes techniques mentionnées précédemment, peu d'études ont porté spécifiquement sur la fraction ultra-fine de la pollution atmosphérique. Toutefois, la mise au point d'appareils permettant de concentrer sélectivement (jusqu'à 30 fois) les différentes fractions de la pollution particulaire (grossières, fines et ultrafines) a permis d'étudier plus en détail l'influence de la taille sur la toxicité de l'aérosol solide environnemental (Kim et coll., 2001a, 2001b).

Plusieurs études *in vitro* ont montré que la fraction ultra-fine avait des effets toxiques plus importants que les fractions plus grossières.

Des particules collectées dans la région de Los Angeles et séparées en fractions grossière (2,5-10 μm), fine et ultra-fine (0-2,5 μm) et ultra-fine seule (< 0,15 μm) ont été analysées d'un point de vue chimique. L'activité oxydo-réductrice des particules

(évaluée par la capacité du DTT à réduire l'oxygène en ion superoxyde) était beaucoup plus marquée pour la fraction ultra-fine (Cho et coll., 2005). Cette dernière était plus riche en composés organiques, alors que la fraction grossière comportait plus d'ions métalliques et inorganiques. Les métaux de transition catalysent la formation du radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène (réaction de Fenton) mais ne sont pas actifs dans la réaction avec le DTT, qui est catalysée par des composés organiques tels que les HAP et quinones. Dans le cas précis de ces échantillons, les composés organiques carbonés jouent un rôle important dans le potentiel oxydo-réducteur des ultra-fines.

La même équipe avait précédemment montré que la fraction ultra-fine de ces mêmes particules induisait plus fortement la production d'hème-oxygénase-1 (un marqueur de stress oxydant) et la diminution de glutathion intracellulaire dans une lignée de macrophages et de cellules épithéliales bronchiques (Li et coll., 2003). L'examen des cellules en microscopie électronique a permis de montrer que la fraction ultra-fine et, dans une moindre mesure la fraction fine, se retrouvaient dans les mitochondries, alors que la fraction grossière était collectée dans de grandes vacuoles cytoplasmiques. Dans ce dernier cas, l'architecture mitochondriale était intacte, alors que dans le cas des fines/ultra-fines, des lésions structurelles importantes de la mitochondries étaient observées, pouvant contribuer au stress oxydant (Li et coll., 2003). Par la suite, il a été montré que ces effets sur la mitochondrie seraient plutôt dus aux composés chimiques adsorbés qu'à la particule elle-même (Xia et coll., 2004). Ces résultats montrent que la toxicité plus grande de la fraction ultra-fine de particules environnementales est liée au contenu en composés organiques oxydo-réducteurs et à la capacité à léser les mitochondries.

La toxicité des particules fines/ultra-fines atmosphériques a été également étudiée chez l'animal. Des rats exposés durant 3 jours (4 h/j) à la fraction fine et ultra-fine de particules urbaines collectées à Fresno et concentrées 20 fois (190 à 847 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) présentaient des effets cellulaires significatifs (augmentation du nombre de cellules totales et de neutrophiles dans le LBA et diminution de leur viabilité) au niveau pulmonaire (Smith et coll., 2003).

La réponse allergique de souris sensibilisées à l'ovalbumine et exposées à un mélange de CAP fines et ultra-fines collectées à 50 ou 150 mètres d'une route était plus marquée (augmentation de l'IL-5, des IgE et IgG₁ sériques et des éosinophiles) que chez les souris témoins. De plus, un effet distance a été observé : l'augmentation était plus importante avec les CAP collectées à 50 m qu'avec celles collectées à 150 m (Kleinman et coll., 2005).

Ces deux études montrent des effets biologiques substantiels à des teneurs plus basses, et donc plus réalistes, que pour les études menées précédemment sur les CAP, qui ne comportaient que la fraction fine.

Si la plupart des études s'accordent à montrer un effet plus important des PUF par rapport aux fractions plus grossières, certains travaux ont montré des résultats diamétralement opposés.

Des macrophages alvéolaires humains ont été exposés à différentes fractions (grossière 2,5-10 μm , fine 0,1-2,5 μm et ultra-fine) de particules urbaines collectées en Hollande. La production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, MIP-1 α) était taille-dépendante, avec des effets plus marqués pour la fraction la plus grosse, pour une masse de particules donnée (Becker et coll., 2003). Cette production de cytokines était inhibée par ajout d'un anticorps anti-CD14 (un récepteur impliqué dans la stimulation des macrophages par les endotoxines) et requérait la présence de sérum pour une stimulation optimale, suggérant que des produits bactériens étaient responsables de cet effet des fractions grossière et fine. De façon similaire, la phagocytose des bactéries ainsi que l'expression du CD11b (un récepteur impliqué dans la phagocytose) étaient inhibées de façon taille-dépendante (fraction grossière > fraction fine), alors que la fraction ultra-fine était sans effet. Ces résultats suggèrent que la reconnaissance des particules par les macrophages alvéolaires humains implique des récepteurs reconnaissant des structures microbiennes et que ces micro-organismes, présents plutôt sur les fractions fines et grossières pourraient être impliqués dans les phénomènes inflammatoires et d'altération des défenses immunitaires associés à l'exposition aux particules atmosphériques (Becker et coll., 2003). La fraction grossière de particules environnementales a également été impliquée, à la différence des fractions fines et ultra-fines, dans la sécrétion accrue d'IL-16, qui est une cytokine attractrice des lymphocytes CD4⁺ (Becker et Soukup, 2003).

Conclusion générale

Les études portant sur les fractions particulières de la pollution de l'air (particules environnementales) ne permettent pas toujours de dégager une spécificité des PUF en termes de toxicité. Il est en effet difficile d'isoler plusieurs fractions de la pollution atmosphérique ne différant que par la taille. L'étude de Dick et coll. (2003) présentée dans le tableau 4.I en est un bon exemple. Les différentes fractions granulométriques séparées à partir d'un même aérosol urbain différaient par leur composition chimique, en plus de la taille, rendant difficile la mise en cause du seul facteur taille dans les éventuelles différences de toxicité observées entre les fractions.

L'utilisation d'appareils permettant de concentrer spécifiquement la fraction fine, voire ultra-fine, de l'aérosol particulaire en temps réel a permis de conserver une certaine représentativité de l'exposition et de faciliter la recherche des éléments causaux ; cependant, l'interprétation reste difficile en raison de la variabilité des caractéristiques physicochimiques des CAP au cours du temps (qui reflète et souligne d'ailleurs toute la variabilité de la pollution atmosphérique, notamment particulaire).

Une autre approche consiste à utiliser en laboratoire des modèles de PUF ne différant strictement que par la taille (par exemple dioxyde de titane ou noir de carbone). Bien que discutable, car utilisant des modèles de particules peu représentatives de l'aérosol particulaire ambiant, cette approche a permis de montrer une toxicité potentielle plus grande des particules de petite taille par rapport à des particules plus grosses de même nature. Ceci a permis, indirectement, de renforcer l'hypothèse d'un rôle non négligeable de la fraction ultra-fine de l'aérosol urbain dans sa toxicité.

La recherche des déterminants de la toxicité de l'aérosol urbain est loin d'être terminée. Des travaux récents ont mis en évidence la présence de nanotubes de carbone multifeuillets et d'agréats de nanoparticules carbonées de taille inhalable dans des échantillons de particules urbaines collectées au Texas (villes de Houston et El Paso ; Murr et coll., 2004a). Cette équipe a également mis en évidence la présence de fullerènes et de nanotubes de carbone dans des agrégats de taille inférieure à 1 µm échantillonnés dans de la glace datée d'environ 10 000 ans (Murr et coll., 2004c). Ces composés sont issus de la combustion de propane et de gaz naturel (Murr et coll., 2004b) mais les atomes de carbone formés dans les chambres à combustion des moteurs automobiles à partir de l'essence pourraient générer des nanotubes de carbone multifeuillets (Lam et coll., 2006). L'équipe de Murr en a conclu que les nanotubes et les nanoparticules de carbone sont ubiquitaires dans l'environnement, et pourraient même être des constituants importants de la fraction particulaire de la pollution atmosphérique. Plusieurs études récentes ont montré que les nanotubes de carbone induisaient chez le rat et la souris des altérations histologiques et biochimiques au niveau pulmonaire (voir chapitre 6, point 4), ce qui laisse à penser qu'ils pourraient être impliqués dans la toxicité induite notamment par la fraction fine de la pollution atmosphérique (Lam et coll., 2006). Des études complémentaires, notamment épidémiologiques, seront nécessaires pour démontrer ce lien, qui n'est que suspecté à l'heure actuelle.

Bibliographie

- Adamson IY, Vincent R, Bakowska J (2003). Differential production of metalloproteinases after instilling various urban air particle samples to rat lung. *Exp Lung Res* **29** (6), 375-388.
- Batalha JR, Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Koutrakis P, Godleski JJ (2002). Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ Health Perspect* **110** (12), 1191-1197.
- Becker S, Soukup JM (1999). Exposure to urban air particulates alters the macrophage-mediated inflammatory response to respiratory viral infection. *J Toxicol Environ Health A* **57** (7), 445-457.
- Becker S, Soukup JM (2003). Coarse (PM_{2.5-10}), fine (PM_{2.5}), and ultrafine air pollution particles induce/increase immune costimulatory receptors on human blood-derived monocytes but not on alveolar macrophages. *J Toxicol Env Health Pt A* **66** (9), 847-859.

- Becker S, Soukup JM, Gilmour MI, Devlin RB (1996). Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol* **141** (2), 637-648.
- Becker S, Soukup JM, Sioutas C, Cassee FR (2003). Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Exp Lung Res* **29** (1), 29-44.
- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* **175** (3), 191-199.
- Cassee FR, Boere AJ, Fokkens PH, Leseman DL, Sioutas C, Kooter IM, Dormans JA (2005). Inhalation of concentrated particulate matter produces pulmonary inflammation and systemic biological effects in compromised rats. *J Toxicol Environ Health A* **68** (10), 773-796.
- Cho AK, Sioutas C, Miguel AH, Kumagai Y, Schmitz DA, Singh M, Eiguren-Fernandez A, Froines JR (2005). Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environ Res* **99** (1), 40-47.
- Clarke RW, Catalano P, Coull B, Koutrakis P, Murthy GGK, Rice T, Godleski JJ (2000a). Age-related responses in rats to concentrated urban air particles (CAPs). *Inhal Toxicol* **12**, 73-84.
- Clarke RW, Coull B, Reinisch U, Catalano P, Killingsworth CR, Koutrakis P, Kavouras I, Murthy GG, Lawrence J, Lovett E, Wolfson JM, Verrier RL, Godleski JJ (2000b). Inhaled concentrated ambient particles are associated with hematologic and bronchoalveolar lavage changes in canines. *Environ Health Perspect* **108** (12), 1179-1187.
- Costa DL, Dreher KL (1997). Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *Environ Health Perspect* **105** (Suppl. 5), 1053-1060.
- Dick CA, Singh P, Daniels M, Evansky P, Becker S, Gilmour MI (2003). Murine pulmonary inflammatory responses following instillation of size-fractionated ambient particulate matter. *J Toxicol Environ Health A* **66** (23), 2193-2207.
- Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V (2002). The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* **15** (2), 213-220.
- Donaldson K, Li XY, MacNee W (1998). Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci* **29**, 553-560.
- Donaldson K, Stone V, Borm PJA, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RPF, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀). *Free Radic Biol Med* **34** (11), 1369-1382.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W (2001). Ultrafine particles. *Occup Environ Med* **58** (3), 211-216, 199.
- Dreher KL (2000). Particulate matter physicochemistry and toxicology: In search of causality - A critical perspective. *Inhal Toxicol* **12**, 45-57.
- Dye JA, Lehmann JR, McGee JK, Winsett DW, Ledbetter AD, Everitt JI, Ghio AJ, Costa DL (2001). Acute pulmonary toxicity of particulate matter filter extracts in rats: coherence with epidemiologic studies in Utah Valley residents. *Environ Health Perspect* **109** (Suppl. 3), 395-403.

- Ghio AJ, Huang YC (2004). Exposure to concentrated ambient particles (CAPs): a review. *Inhal Toxicol* **16** (1), 53-59.
- Ghio AJ, Suliman HB, Carter JD, Abushamaa AM, Folz RJ (2002). Overexpression of extracellular superoxide dismutase decreases lung injury after exposure to oil fly ash. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* **283** (1), L211-L218.
- Goldsmith CA, Frevert C, Imrich A, Sioutas C, Kobzik L (1997). Alveolar macrophage interaction with air pollution particulates. *Environ Health Perspect* **105** (Suppl. 5), 1191-1195.
- Goldsmith CAW, Hamada K, Ning YY, Qin GZ, Catalano P, Murthy GGK, Lawrence J, Kobzik L (1999). Effects of environmental aerosols on airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Inhal Toxicol* **11** (11), 981-998.
- Gordon T, Nadziejko C, Schlesinger R, Chen LC (1998). Pulmonary and cardiovascular effects of acute exposure to concentrated ambient particulate matter in rats. *Toxicol Lett* **96** (97), 285-288.
- Green LC, Armstrong SR (2003). Particulate matter in ambient air and mortality: toxicologic perspectives. *Regul Toxicol Pharmacol* **38** (3), 326-335.
- Greenwell LL, Moreno T, Richards RJ (2003). Pulmonary antioxidants exert differential protective effects against urban and industrial particulate matter. *J Biosci* **28** (1), 101-107.
- Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, Gonzalez-Flecha B (2002). Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect* **110** (8), 749-755.
- Hamilton RF, Jr., Holian A, Morandi MT (2004). A comparison of asbestos and urban particulate matter in the *in vitro* modification of human alveolar macrophage antigen-presenting cell function. *Exp Lung Res* **30** (2), 147-162.
- Hatch GE, Boykin E, Graham JA, Lewtas J, Pott F, Loud K, Mumford JL (1985). Inhalable particles and pulmonary host defense: *in vivo* and *in vitro* effects of ambient air and combustion particles. *Environ Res* **36** (1), 67-80.
- Höhr D, Steinfartz Y, Schins RPF, Knaapen AM, Martra G, Fubini B, Borm PJA (2002). The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *Int J Hyg Environ Health* **205** (3), 239-244.
- Jimenez LA, Drost EM, Gilmour PS, Rahman I, Antonicelli F, Ritchie H, MacNee W, Donaldson K (2002). PM(10)-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF-alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282** (2), L237-L248.
- Kadiiska MB, Mason RP, Dreher KL, Costa DL, Ghio AJ (1997). *In vivo* evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. *Chem Res Toxicol* **10** (10), 1104-1108.
- Kim S, Jaques PA, Chang M, Barone T, Xiong C, Friedlander SK, Sioutas C (2001a). Versatile aerosol concentration enrichment system (VACES) for simultaneous *in vivo* and *in vitro* evaluation of toxic effects of ultrafine, fine and coarse ambient particles. Part II: Field evaluation. *Aerosol Science* **32**, 1299-1314.
- Kim S, Jaques PA, Chang M, Froines JR, Sioutas C (2001b). Versatile aerosol concentration enrichment system (VACES) for simultaneous *in vivo* and *in vitro* evaluation of toxic effects of ultrafine, fine and coarse ambient particles. Part I: Development and laboratory characterisation. *Aerosol Science* **32**, 1281-1297.

- Kleinman MT, Hamade A, Meacher D, Oldham M, Sioutas C, Chakrabarti L, Stram D, Froines JR, Cho AK (2005). Inhalation of concentrated ambient particulate matter near a heavily trafficked road stimulates antigen-induced airway responses in mice. *J Air Waste Manage Assoc* **55** (9), 1277-1288.
- Kleinman MT, Sioutas C, Chang MC, Boere AJ, Cassee FR (2003). Ambient fine and coarse particle suppression of alveolar macrophage functions. *Toxicol Lett* **137** (3), 151-158.
- Kodavanti UP, Mebane R, Ledbetter A, Krantz T, McGee J, Jackson MC, Walsh L, Hilliard H, Chen BY, Richards J, Costa DL (2000). Variable pulmonary responses from exposure to concentrated ambient air particles in a rat model of bronchitis. *Toxicol Sci* **54** (2), 441-451.
- Kodavanti UP, Moyer CF, Ledbetter AD, Schladweiler MC, Costa DL, Hauser R, Christiani DC, Nyska A, McGee J, Richards JR (2003). Inhaled environmental combustion particles cause myocardial injury in the Wistar Kyoto rat. *Toxicol Sci* **71** (2), 237-245.
- Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD, McGee JK, Walsh L, Gilmour PS, Highfill JW, Davies D, Pinkerton KE, Richards JH, Crissman K, Andrews D, Costa DL (2005). Consistent pulmonary and systemic responses from inhalation of fine concentrated ambient particles: roles of rat strains used and physicochemical properties. *Environ Health Perspect* **113** (11), 1561-1568.
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Arepalli S, Hunter RL (2006). A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit Rev Toxicol* **36** (3), 189-217.
- Last JA, Ward R, Temple L, Pinkerton KE, Kenyon NJ (2004). Ovalbumin-induced airway inflammation and fibrosis in mice also exposed to ultrafine particles. *Inhal Toxicol* **16** (2), 93-102.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang MY, Oberley T, Froines J, Nel A (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* **111** (4), 455-460.
- Li XY, Brown D, Smith S, MacNee W, Donaldson K (1999). Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* **11** (8), 709-731.
- Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W (1997). *In vivo* and *in vitro* proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10). *Environ Health Perspect* **105** (Suppl. 5), 1279-1283.
- Lison D, Lardot C, Huaux F, Zanetti G, Fubini B (1997). Influence of particle surface area on the toxicity of insoluble manganese dioxide dusts. *Arch Toxicol* **71** (12), 725-729.
- Liu X, Meng Z (2005). Effects of airborne fine particulate matter on antioxidant capacity and lipid peroxidation in multiple organs of rats. *Inhal Toxicol* **17** (9), 467-473.
- Long CM, Suh HH, Kobzik L, Catalano PJ, Ning YY, Koutrakis P (2001). A pilot investigation of the relative toxicity of indoor and outdoor fine particles: In vitro effects of endotoxin and other particulate properties. *Environ Health Perspect* **109** (10), 1019-1026.
- Murr LE, Bang JJ, Esquivel EV, Guerrero PA, Lopez DA (2004a). Carbon nanotubes, nanocrystal forms, and complex nanoparticle aggregates in common fuel-gas combustion sources and the ambient air. *J Nanoparticle Res* **6**, 241-251.

- Murr LE, Bang JJ, Lopez DA, Guerrero PA, Esquivel EV, Choudhuri AR, Subramanya M, Morandi M, Holian A (2004b). Carbon nanotubes and nanocrystals in methane combustion and the environmental implications. *J Mater Sci* **39**, 2199-2204.
- Murr LE, Esquivel EV, Bang JJ, de la Rosa G, Gardea-Torresdey JL (2004c). Chemistry and nanoparticulate compositions of a 10,000 year-old ice core melt water. *Water Res* **38** (19), 4282-4296.
- Oberdörster G (1995). Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. *Regul Toxicol Pharmacol* **21** (1), 123-135.
- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE (1994). Correlation between particle size, *in vivo* particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* **102** (Suppl. 5), 173-179.
- Oberdörster G, Utell MJ (2002). Ultrafine particles in the urban air: To the respiratory tract - And beyond? *Environ Health Perspect* **110** (8), A440-A441.
- Osier M, Oberdörster G (1997). Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fundam Appl Toxicol* **40** (2), 220-227.
- Pooley FD, Mille M (1999). Composition of air pollution particles in, *Air pollution and health*, Holgate ST, Samet JM, Koren HS and Maynard RL (Eds), Academic press, London, pp. 619-634.
- Pope CA, Dockery DW (1999). Epidemiology of particle effects in, *Air pollution and health*, Holgate ST, Samet, J.M., Koren, H.S., Maynard, R.L. (Ed), Academic Press, London, pp. 673-705.
- Pozzi R, De Berardis B, Paoletti L, Guastadisegni C (2003). Inflammatory mediators induced by coarse (PM_{2.5-10}) and fine (PM_{2.5}) urban air particles in RAW 264.7 cells. *Toxicology* **183** (1-3), 243-254.
- Pozzi R, De Berardis B, Paoletti L, Guastadisegni C (2005). Winter urban air particles from Rome (Italy): effects on the monocytic-macrophagic RAW 264.7 cell line. *Environ Res* **99** (3), 344-354.
- Prieditis H, Adamson IY (2002). Comparative pulmonary toxicity of various soluble metals found in urban particulate dusts. *Exp Lung Res* **28** (7), 563-576.
- Pritchard RJ, Ghio AJ, Lehmann JR, Winsett DW, Tepper JS, Park P, Gilmour IM, Dreher KL, Costa DL (1996). Oxidant generation and lung injury after particulate air pollutant exposure increase with the concentrations of associated metals. *Inhal Toxicol* **8**, 457-477.
- Rhoden CR, Lawrence J, Godleski JJ, Gonzalez-Flecha B (2004). N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicol Sci* **79** (2), 296-303.
- Rodriguez Ferreira Rivero DH, Sasaki C, Lorenzi-Filho G, Nascimento Saldiva PH (2005). PM_{2.5} induces acute electrocardiographic alterations in healthy rats. *Environ Res* **99** (2), 262-266.
- Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GGK, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ (2002). Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med* **165** (12), 1610-1617.
- Salvi S, Holgate ST (1999). Mechanisms of particulate matter toxicity. *Clin Exp Allergy* **29** (9), 1187-1194.

- Smith KR, Kim S, Recendez JJ, Teague SV, Menache MG, Grubbs DE, Sioutas C, Pinkerton KE (2003). Airborne particles of the California central valley alter the lungs of healthy adult rats. *Environ Health Perspect* **111** (7), 902-908.
- Steenenberg P, Verlaan A, De Klerk A, Boere A, Loveren H, Cassee F (2004a). Sensitivity to ozone, diesel exhaust particles, and standardized ambient particulate matter in rats with a listeria monocytogenes-induced respiratory infection. *Inhal Toxicol* **16** (5), 311-317.
- Steenenberg PA, Withagen CE, van Dalen WJ, Dormans JA, Cassee FR, Heisterkamp SH, van Loveren H (2004b). Adjuvant activity of ambient particulate matter of different sites, sizes, and seasons in a respiratory allergy mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol* **200** (3), 186-200.
- Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L (2003). Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med* **35** (4), 327-340.
- Tao F, Kobzik L (2002). Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26** (4), 499-505.
- Veronesi B, Oortgiesen M (2001). Neurogenic inflammation and particulate matter (PM) air pollutants. *Neurotoxicology* **22** (6), 795-810.
- Walters DM, Breyse PN, Wills Karp M (2001). Ambient urban Baltimore particulate-induced airway hyperresponsiveness and inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* **164** (8), 1438-1443.
- Wellenius GA, Coull BA, Godleski JJ, Koutrakis P, Okabe K, Savage ST, Lawrence JE, Murthy GG, Verrier RL (2003). Inhalation of concentrated ambient air particles exacerbates myocardial ischemia in conscious dogs. *Environ Health Perspect* **111** (4), 402-408.
- Wellenius GA, Saldiva PH, Batalha JR, Krishna Murthy GG, Coull BA, Verrier RL, Godleski JJ (2002). Electrocardiographic changes during exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicol Sci* **66** (2), 327-335.
- Wichers LB, Nolan JP, Winsett DW, Ledbetter AD, Kodavanti UP, Schladweiler MC, Costa DL, Watkinson WP (2004). Effects of instilled combustion-derived particles in spontaneously hypertensive rats. Part I: Cardiovascular responses. *Inhal Toxicol* **16** (6-7), 391-405.
- Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A (2004). Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: Implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect* **112** (14), 1347-1358.
- Zelikoff JT, Chen LC, Cohen MD, Fang K, Gordon T, Li Y, Nadziejko C, Schlesinger RB (2003). Effects of inhaled ambient particulate matter on pulmonary antimicrobial immune defense. *Inhal Toxicol* **15** (2), 131-150.
- Zhang Q, Kusaka Y, Donaldson K (2000). Comparative pulmonary responses caused by exposure to standard cobalt and ultrafine cobalt. *J Occup Health* **42**, 179-184.
- Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, Nakakuki K, Kohyama N, Donaldson K (1998). Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *J Toxicol Environ Health A* **53** (6), 423-438.

2. Études épidémiologiques des effets sur la santé des particules ultra-fines environnementales

N. Massin, D. Ambroise

Introduction

Les études épidémiologiques portant sur la contamination particulaire de l'air sont très nombreuses, tant en milieu professionnel que pour la population générale. L'évolution de leur qualité a été fortement liée à l'amélioration des méthodes de mesure de l'exposition des sujets. Les études les plus anciennes faisaient appel à une mesure pondérale globale des « poussières » et ont permis la mise en évidence de diverses pathologies professionnelles respiratoires dites de surcharge. Les études plus récentes reposaient quant à elles sur un échantillonnage sélectif de particules et déterminaient ainsi des expositions à des fractions d'aérosols exprimées en unités pondérales ou en nombre des particules : fractions inhalable, thoracique, alvéolaire. Ce n'est que récemment que les études épidémiologiques ont aussi pris en compte les particules ultra-fines (PUF).

2.1. Types d'études

Différents types d'études épidémiologiques ont été utilisés dans le domaine environnemental. Celles qui sont fondées sur un suivi prospectif sont les plus récentes, car elles nécessitent des outils de calcul puissants. Elles ont permis d'enrichir considérablement les connaissances dans le domaine des effets des particules de l'air sur la santé.

2.1.1. Études de cohorte

Elles consistent, comme leur nom l'indique, à suivre de grandes populations pendant plusieurs années. La plupart étudient la mortalité et enregistrent les décès survenus pendant la période de suivi. Les taux de mortalité toutes causes ou pour des causes spécifiques (par affections cardiorespiratoires ou par cancer) sont calculés en fonction de l'exposition particulaire moyenne mesurée sur de longues périodes. Elles étudient les effets à long terme des particules.

2.1.2. Séries temporelles

Elles étudient les covariations temporelles, au jour le jour, entre la mortalité ou la morbidité journalières, dans la population générale d'une part et, d'autre part, les niveaux journaliers de la pollution à laquelle cette population est soumise. Elles sont généralement réalisées en milieu urbain et étudient les effets à court terme des particules.

2.1.3. Études de panel

Un groupe de sujets répondant à des critères d'inclusion précis est suivi pendant un certain temps ; pendant cette période, des données sanitaires telles que symptômes, maladies, variations fonctionnelles ou prise de médicaments sont recueillies chaque jour à l'échelon individuel ; les variations de la pollution atmosphérique sont aussi mesurées, mais le plus souvent à un niveau collectif. Les effets à court terme de la pollution sont étudiés de cette manière chez des sujets à risque (personnes âgées, enfants, asthmatiques, coronariens...). L'intérêt de ces études réside dans le fait que chaque sujet, suivi dans le temps à plusieurs reprises, est son propre témoin et que les informations sanitaires sont plus précises que dans les études précédentes, qui emploient des données agrégées (Desqueyroux, 1999).

2.1.4. Études transversales

Les sujets sont observés à un moment donné et les informations recueillies portent sur leur exposition et leur état de santé (maladie, symptôme, caractéristique biologique...). L'exposition et les données de santé sont mesurées au moment de l'enquête. La fréquence des effets sanitaires est comparée entre exposés et non exposés.

2.2. Principaux résultats des études portant sur les fractions particulaires PM₁₀ et PM_{2,5}

2.2.1. Études de cohortes

Les études de cohortes relatives aux populations urbaines sont relativement anciennes et portent sur les PM₁₀ et les PM_{2,5}. En voici quelques exemples.

L'étude des Six Cities (*Harvard Six Cities Study*) a débuté dans les années 1970 ; les résultats ont été publiés en 1993 par Dockery et coll. Cette étude, ainsi que deux autres parmi les quatre grandes études de cohorte américaines : l'*American Cancer Society Study*

(ACS : Pope et coll., 1995, 2002) et l'*AHSMOG Study* (Adventist Health Study of SMOG : Abbey et coll., 1999 ; McDonnell et coll., 2000), ont montré une augmentation du risque relatif (RR) pour la mortalité toutes causes, pour la mortalité cardiopulmonaire et par cancer dans les populations exposées à la pollution particulaire urbaine. Ces augmentations du RR étaient significatives dans la plupart des études. Une autre étude, celle des *Veterans' Administration Cohort Mortality Study* (VA : Lipfert et coll., 2000), montre une association négative entre mortalité toutes causes et $PM_{2,5}$. En raison de doutes concernant le modèle statistique utilisé lors de la première analyse, les études de Dockery et coll. (1993) et Pope et coll. (1995) ont été réanalysées selon une méthodologie différente (Krewski et coll., 2000, 2003) ; ces nouvelles analyses confirment les premiers résultats.

Plus récemment, deux études longitudinales européennes ont été publiées. Dans la *Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer* (âges 55-69 ans) entre 1986 et 1994, il a été constaté une augmentation de mortalité cardiopulmonaire associée à la distance de l'habitation à une route principale (RR : 1,95 ; IC95 : 1,09-3,52 ; Hoek et coll., 2002). La *Dublin Intervention Study*, qui cherchait les effets de la diminution de l'utilisation de charbon sur les taux de mortalité, a mis en évidence une association entre la diminution de 70 % ($35,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$) des fumées noires et la diminution de 15 % (IC 12-19 %) des décès de cause pulmonaire et de 10,3 % (IC 8-13 %) de la mortalité cardiovasculaire (Clancy et coll., 2002).

2.2.2. Séries temporelles

Au cours des dix dernières années, les estimations des effets dans les études de séries temporelles montrent une tendance à la baisse. Une compilation de dix études de séries temporelles réalisées aux États-Unis donne une estimation du RR (mortalité toutes causes) de 1,06 associée à une augmentation de $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de particules totales en suspension (Schwartz, 1994). Cela correspondrait à un RR de 1,01 pour une augmentation de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de la concentration en PM_{10} .

Les RR (mortalité toutes causes) trouvés dans la *National Morbidity, Mortality and Air Pollution Study* (NMMAPS) basés sur les données des vingt plus grandes villes américaines d'une part et 90 autres villes d'autre part sont de 1,005 et 1,0041 respectivement (HEI, 2003), l'exposition concernant les PM_{10} . Les chiffres obtenus dans l'étude APHEA 2 (*Air Pollution and Health: a European Approach*) en Europe, basés sur la mortalité dans 21 villes européennes, sont du même ordre de grandeur : 1,0062 (WHO, 2003).

2.2.3. Études transversales

Plusieurs études transversales ont trouvé des associations significatives entre pollution particulaire urbaine et augmentation de la prévalence de la toux, des sifflements

thoraciques et de la bronchite (Dockery et coll., 1996 ; Heinrich et coll., 2000 ; 2002). D'autres travaux ont montré une diminution de la fonction respiratoire (Ackermann-Liebrich et coll., 1997), ainsi qu'une augmentation des lymphocytes et des IgE dans le sang périphérique (Leonardi et coll., 2000) dans des groupes de sujets issus de la population générale. Ces travaux n'ont toutefois pas permis d'écarter tous les éventuels facteurs de confusion, ni de mettre en évidence une relation dose-effet.

2.3. PUF et études épidémiologiques

Actuellement, les études portant sur les effets des PUF proprement dites sont peu nombreuses. Nous n'en avons pas trouvé en milieu professionnel. Elles prennent en compte les PUF, mais aussi les PM_{2,5} et les PM₁₀. Une seule étude de mortalité de type série temporelle a été publiée, de même que quelques études de morbidité, toutes des études de panel. Leurs résultats sont synthétisés ci-après.

2.3.1. Étude de mortalité

Mortalité journalière et particules fines et ultra-fines à Erfurt, Allemagne : rôle du nombre et de la masse des particules (Wichmann et coll., 2000.)

C'est la première, et à ce jour, la seule étude de mortalité trouvée prenant en compte les PUF.

Objectifs – Identifier le type de particules (fines ou ultra-fines) associé à la mortalité toutes causes ou par causes spécifiques ; rechercher si la mortalité est associée plus fortement au nombre ou à la masse des particules ; rechercher quels sont les groupes de population dont la mortalité est le plus fortement liée à la pollution atmosphérique.

Lieu et période – L'étude a été réalisée à Erfurt, ville d'environ 200 000 habitants, située en Allemagne, dans une vallée entourée de montagnes sur trois côtés. Le recueil des données s'est déroulé de façon prospective, pendant une période de trois ans et demi, entre août 1995 et décembre 1998.

Type d'étude – Il s'agit d'une étude de mortalité prospective avec étude de série temporelle. Au total, 6 793 décès ont été comptabilisés, et les causes de décès obtenues d'après les certificats de décès fournis par les autorités sanitaires locales. Les nombres de décès journaliers ont été recensés et rapportés à l'exposition journalière. Les décès toutes causes et par causes spécifiques ont été distingués.

Mesure de l'exposition – L'exposition a été mesurée sur un seul site, à 2 km du centre de la ville, à environ 50 m d'une route importante et à proximité de maisons d'habitation, de bureaux, d'une école et d'un hôpital : trafic routier et chauffage domestique étaient les sources principales de la pollution. Les concentrations particulières ont été mesurées quotidiennement pendant 40 mois, de même que les concentrations en différents

polluants gazeux. Les dénombrements de particules ont utilisé trois types d'appareils (Differential Mobility Analyser pour les particules de diamètre compris entre 0,01-0,5µm, Optical Laser Aerosol Spectrometer pour les particules de diamètre allant de 0,1 à 2,5µm, et compteur à noyaux de condensation pour celles de 0,003 à 3,0 µm). Pour la mesure pondérale des PM_{2,5} et des PM₁₀, le Harvard Impactor était utilisé.

Les concentrations pondérales et les concentrations en nombre ont été mesurées pour trois tailles de PUF (0,01-0,03 ; 0,03-0,05 et 0,05-0,1 µm de diamètre) et pour trois tailles de particules fines (0,1-0,5 ; 0,5-1,0 et 1,0-2,5 µm de diamètre). Les particules plus grosses, de 2,5 à 10 µm et de 10 à 40 µm de diamètre, étaient aussi prises en compte.

Facteurs de confusion pris en compte à l'origine de l'étude par les auteurs : les données météorologiques (température, humidité, vitesse et direction du vent) et les épisodes de grippe étaient également documentés.

Analyse statistique – Régression de Poisson et modèle additif généralisé. Le jour de survenue du décès ou les jours antérieurs (effet décalé dans le temps) ont été pris en compte. Plusieurs modèles ont été utilisés pour tester la stabilité des résultats.

Résultats :

• Sur toute la durée de l'étude, les concentrations journalières moyennes en nombre (CN, en particules par cm³ ± 1 écart type) ou en masse (en µg/cm³ ± 1 écart type) des différentes catégories de particules étaient les suivantes (tableau 4.II) :

Concentrations en nombre (cm ⁻³)	Concentrations en masse (µg/cm ³)
CN _{0,01-0,03} : 10 410 (± 7 077)	C _{0,01-0,03} : 0,04 (± 0,03)
CN _{0,03-0,05} : 3 285 (± 2 394)	C _{0,03-0,05} : 0,1 (± 0,09)
CN _{0,05-0,1} : 2 023 (± 1 577)	C _{0,05-0,1} : 0,5 (± 0,4)
CN _{0,1-0,5} : 2 123 (± 1 515)	C _{0,1-0,5} : 20,1 (± 16,1)
CN _{0,5-1,0} : 19 (± 26)	C _{0,5-1,0} : 3,7 (± 5,2)
CN _{0,1-2,5} : 0,7 (± 0,7)	C _{0,1-2,5} : 1,3 (± 1,2)

Tableau 4.II. Concentrations moyennes de particules, en masse et en nombre, relevées au cours de l'étude (Wichmann et coll., 2000).

• Les concentrations de tous les types de particules sont fortement liées à la saison, avec des concentrations maximales en hiver. La concentration massique des particules fines diminue cependant au cours de chaque hiver alors que le nombre reste constant. L'explication avancée par les auteurs est que le nombre de particules fines diminue alors que celui des PUF augmente durant cette saison.

• Les concentrations de PUF varient selon le jour de la semaine avec une diminution de près de 40 % en fin de semaine. Ceci, ainsi qu'une augmentation nette des concentrations de PUF aux heures de circulation, suggère que la source principale des PUF est le trafic automobile.

- Une association entre la mortalité et les concentrations en nombre (CN) et concentration massique a été trouvée, pour des classes de particules de taille différente (particules fines et ultra-fines) et pour des effets à la fois immédiats (délai de 0 ou 1 jour) ou retardés (délai de 4 ou 5 jours).
- Il existe une tendance pour des effets plus immédiats des concentrations pondérales (qui sont influencées surtout par des particules de taille plus grande) et pour des effets plus retardés pour les concentrations en nombre (c'est-à-dire pour les particules de plus petite taille). Cependant, ceci ne peut être affirmé avec certitude.
- L'association entre exposition et effets sur la santé est observée pour la mortalité totale mais aussi pour la mortalité par causes respiratoires et cardiovasculaires. Les décès par causes respiratoires semblent survenir à plus court terme que les décès par causes cardiovasculaires.
- La relation entre mortalité et particules ambiantes persiste après ajustement sur la saison, les épidémies de grippe, le jour de la semaine et les conditions météorologiques.

2.3.2. Études de morbidité

Les études de morbidité concernant les PUF sont toutes des études de panel.

Les effectifs des populations suivies sont de petite taille, de 23 à 131 personnes, sélectionnées d'après des critères précis (asthme dans toutes les études et bronchopneumopathie obstructive dans l'une d'elles, absence de tabagisme, prise de médicaments, symptômes...) au sein de groupes plus importants. Certaines études portent sur des sujets à risque tels que les enfants.

La durée du suivi va de trois à six mois. Certaines mesures de paramètres sanitaires sont répétées plusieurs fois par jour (par exemple 3 fois par jour pour le débit expiratoire de pointe – DEP), ce qui permet d'obtenir un grand nombre de mesures pour l'analyse.

L'analyse statistique utilise dans tous les cas des régressions linéaires ou logistiques en se servant de modèles adaptés aux séries temporelles, en particulier en tenant compte de l'auto-corrélation des données.

| Morbidité respiratoire

1) Les effets respiratoires sont associés au nombre de particules ultra-fines (Peters et coll., 1997).

Lieu et période – Cette étude a été conduite entre octobre 1991 et mars 1992 à Erfurt ; les sources de pollution sont les mêmes que précédemment.

Population – Vingt-sept adultes non fumeurs, ayant entre 44 et 80 ans, asthmatiques ; 23 participants avaient un traitement pour l'asthme ; 13 personnes étaient allergiques (poussière de maison, pollen, poils d'animaux, moisissures).

Effets sur la santé recherchés – Symptômes journaliers, suivi quotidien du DEP (3 fois par jour), avant et après prise d'un médicament.

Mesure de l'exposition – Pour les PUF, un Electrical Mobility Analyser, qui compte les particules entre 0,01 et 0,3 μm , a été utilisé ; pour les particules fines, c'est un Optical Laser Aerosol Spectrometer, qui compte les particules de 0,1 à 2,5 μm . Les PM_{10} ont été mesurées avec un Harvard Impactor. Tous les prélèvements ont été faits au même endroit, à 1 km au sud de la ville, à 40 mètres d'une grande route.

Les catégories de particules prises en compte (concentrations pondérales et en nombre) sont les suivantes : 0,01-0,1 μm ; 0,1-0,5 μm ; 0,5 - 2,5 μm .

Facteurs de confusion pris en compte à l'origine de l'étude par les auteurs : température, humidité, auto-corrélation, fin de la semaine, présence d'infections virales pendant les épisodes de pollution.

Résultats – La plupart des particules appartenaient à la fraction ultra-fine, alors que la plus grande partie de la masse était attribuable à des particules de taille 0,1- 0,5 μm . La concentration journalière en nombre des particules de taille 0,01-0,1 μm était de 11 230 (920-39 650) particules/ cm^3 , celle des particules de taille 0,1-0,5 μm était de 3 690 (230-12 430) particules/ cm^3 et celle des particules de taille 0,5-2, 5 μm était de 34 (5-279) particules/ cm^3 . La concentration pondérale journalière des particules de taille 0,01-0,1 μm était de 0,6 (0-3,3) $\mu\text{g}/\text{m}^3$, celle des particules de taille 0,1-0,5 μm de 44,1 (7,4-289,4) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et celle des particules de taille 0,5-2,5 μm était de 7 (0,9-60,4) $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Les expositions aux particules fines et ultra-fines étaient associées à une diminution faible mais cohérente du DEP et une augmentation de la toux et de la sensation de malaise dans la journée. Les effets sur la santé sont associés plutôt avec le nombre de PUF qu'avec la masse des particules fines. Les effets sont plus fortement associés au nombre moyen de particules des cinq jours précédents.

2) Effets des particules ultra-fines et fines de l'air urbain sur le DEP d'enfants ayant des symptômes d'asthme (Pekkanen et coll., 1997).

Lieu et période – Cette étude a été conduite entre février et avril 1994 (57 jours) à Kuopio, ville finlandaise d'environ 85 000 habitants ; les sources principales de pollution étaient le trafic routier, le chauffage municipal et individuel au bois, et une usine de fabrication de carton ondulé.

Population – Trente neuf enfants asthmatiques, âgés de 7 à 12 ans, habitant au centre de la ville, ayant rempli un questionnaire plus de 60 % des 57 jours possibles.

Effets sur la santé recherchés – Suivi du DEP (3 mesures le matin et 3 mesures le soir) avant toute médication.

Mesure de l'exposition – En plus des PM_{10} et des fumées noires (BS), un Electric Aerosol Spectrometer (EAS), localisé dans une seule station, a servi à mesurer les concentrations en nombre des particules classées en 6 catégories de 0,01 à 10 μm .

Facteurs de confusion pris en compte à l'origine de l'étude par les auteurs : température, humidité, caractéristiques du vent, fin de semaine.

Résultats – Le nombre moyen journalier de particules de taille 0,001-0,032 μm était de 29 131 particules/cm³ ; celui des particules de taille 0,032-0,1 μm était de 15 200 particules/cm³. Les autres particules étaient moins nombreuses.

Tous les paramètres d'exposition tendaient à être associés à une diminution du DEP le matin. Les concentrations de PUF étaient cependant moins fortement associées aux variations du DEP que les PM_{10} ou les fumées noires (qui étaient associées significativement au DEP).

3) Pollution atmosphérique par les fines particules, poussière de la route remise en suspension et santé respiratoire chez des enfants symptomatiques (Tühtanen et coll., 1999).

Lieu et période – Comme l'étude précédente, ce travail était conduit à Kuopio au printemps 1995, pendant six semaines.

Population – Quarante-neuf enfants, âgés de 8 à 13 ans, se plaignant de symptômes respiratoires chroniques, ayant rempli un journal pendant au moins 60 % des 6 semaines.

Effets sur la santé recherchés – Suivi du DEP (3 mesures le matin et 3 mesures le soir) avant toute médication et symptômes respiratoires.

Mesure de l'exposition – Elle était effectuée dans un seul site, au centre de la ville avec un Electric Aerosol Spectrometer (EAS) et des Harvard Impactors. La concentration massique pour les PM_{10} et les $PM_{2,5}$, le noir de carbone et les concentrations en nombre (CN) des particules de 0,01 à 10 μm ont été mesurées quotidiennement.

Facteurs de confusion pris en compte à l'origine de l'étude par les auteurs : température, humidité, caractéristiques du vent.

Résultats – Le nombre moyen journalier de particules de taille 0,01-0,1 μm était de 14 700 (6 980 – 40 200) par cm³ ; celui des particules de taille 0,1-1,0 μm était de 538 par cm³. Aucun effet spécifique n'apparaît en liaison avec les PUF.

4) Particules ultra-fines et santé respiratoire chez des adultes asthmatiques (Penttinen et coll., 2001).

Lieu et période – Cette étude a été réalisée à Helsinki (Finlande), de novembre 1996 à avril 1997. La pollution atmosphérique de cette ville est caractérisée par de faibles niveaux d'ozone, des épisodes météorologiques s'accompagnant de hauts niveaux d'autres polluants, et des périodes de remise en suspension des poussières routières. Ces

phénomènes surviennent au printemps, quand les routes sont sèches, après que neige et glace aient fondu. Les particules déposées sur la route sont mises en suspension mécaniquement, sous l'effet du vent et de la circulation. La matière particulaire correspond en grande partie à du sable qui a été répandu sur les routes glacées en hiver et à des constituants du revêtement routier arrachés par les pneus cloutés.

Population – Cinquante-quatre adultes asthmatiques non fumeurs, qui avaient rempli les conditions de participation (c'est-à-dire remplissage du journal et réalisation des DEP) pendant 60 % (125 jours) de la période d'étude. Tous habitaient dans un rayon de 2 kilomètres du centre des prélèvements d'air.

Effets sur la santé recherchés – Mesure par le sujet lui-même du DEP 3 fois par jour (matin, midi et soir ; 3 mesures à chaque fois, la meilleure étant conservée). Symptômes et prises médicamenteuses quotidiennes.

Mesure de l'exposition – Elle était effectuée au centre de Helsinki, dans un seul site. La concentration en nombre (CN) des particules était mesurée en continu en 12 classes granulométriques de 0,10 à 10 μm avec un Electric Aerosol Spectrometer (EAS). Pour des raisons de contrôle de qualité, la CN des particules était aussi mesurée en continu avec un compteur à noyaux de condensation. Le coefficient de corrélation entre les 2 méthodes était de 0,98. La concentration massique des particules (PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$ et PM_1) était mesurée en continu avec des Harvard Impactors.

Facteurs de confusion pris en compte à l'origine de l'étude par les auteurs : paramètres météorologiques, quantité de pollens, épidémie de grippe.

Résultats – La moyenne journalière de la CN des particules de taille 0,01-0,1 était de 14 500 (3 700–46 500) par cm^3 et celle des particules de taille 0,1-1 μm était de 800 (100–2 800) par cm^3 .

Il n'y avait pas de relation entre DEP et concentration pondérale des particules les plus grosses (PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$). En revanche, la concentration journalière moyenne en nombre de particules était associée négativement avec les variations de la mesure du DEP. Les effets les plus marqués étaient liés aux PUF. Il n'apparaissait pas d'effet de la pollution particulaire sur les symptômes ou la prise de médicaments.

5) Concentration en nombre et taille des particules dans l'air urbain : effets sur la spirométrie des adultes asthmatiques (Penttinen et coll., 2001).

Lieu et période – Cette étude complète le travail précédent ; elle se déroule à Helsinki entre novembre 1996 et avril 1997.

Population – Comme précédemment, il s'agissait de 54 adultes asthmatiques non fumeurs, habitant dans un rayon de 2 kilomètres du centre des prélèvements d'air et ayant rempli les conditions de participation pendant 60 % (125 jours) de la période d'étude.

Effets sur la santé recherchés – Là encore, les sujets mesuraient eux-mêmes leur DEP trois fois par jour (matin, après-midi et soir ; 3 mesures à chaque fois, la meilleure étant

conservée). Ils notaient quotidiennement leurs symptômes et leurs prises médicamenteuses. Une spirométrie était effectuée deux fois par semaine dans un centre médical (prise en compte de la capacité vitale forcée (CVF), du volume expiratoire maximum en 1 seconde (VEMS) et du DEP).

Mesure de l'exposition – Elle était effectuée au centre de Helsinki, dans un seul site. La CN était mesurée selon la taille en douze classes entre 0,1 μm et 10 μm avec un Electric Aerosol Spectrometer (EAS). Les huit plus petites classes ont été agrégées en deux classes : CN pour les PUF (0,01-0,1 μm ; $\text{CN}_{0,01-0,1}$) et pour les particules de taille 0,1-1 μm ($\text{CN}_{0,1-1}$). Pour des raisons de qualité, la CN a été aussi mesurée en continu avec un compteur à noyaux de condensation (CNC).

Facteurs de confusion pris en compte à l'origine de l'étude par les auteurs : paramètres météorologiques, quantité de pollens, épidémie de grippe.

Résultats – La moyenne journalière de la CN des particules de taille 0,01-0,1 était de 14 500 (3 700-46 500) par cm^3 et celle des particules de taille 0,1-1 μm était de 800 (100-2 800) par cm^3 .

La $\text{CN}_{0,1-1}$ était inversement associée à la valeur du DEP de la spirométrie. Les effets étaient plus marqués avec le DEP de la spirométrie que le DEP réalisé par les sujets eux-mêmes à domicile.

Toujours avec les paramètres spirométriques, des associations non significatives étaient observées avec les PUF, et aucune association avec les PM_{10} .

6) Effets respiratoires aigus des particules : masse ou nombre ? (Osunsanya et coll., 2001).

Lieu et période – Aberdeen en Écosse ; 90 jours durant l'hiver 1998/1999.

Population – Quarante-quatre patients, recrutés dans une clinique de pneumologie, âgés de plus de 50 ans, devaient répondre à deux critères : ils avaient une obstruction bronchique associée à un asthme ou une broncho-pneumopathie obstructive et ils avaient répondu que leur état respiratoire était influencé par le temps. Ils résidaient à moins de 8 kilomètres des sites de mesure de la pollution atmosphérique.

Effets sur la santé recherchés – Un journal était rempli pendant trois mois, contenant les symptômes thoraciques, l'utilisation de médicaments (inhalateurs en particulier) et, matin et soir, le DEP (3 mesures, la meilleure étant retenue). Des scores de gravité étaient évalués pour la toux, la dyspnée et la fréquence d'utilisation de broncho-dilatateurs.

Mesure de l'exposition – Les PUF ont été mesurées en continu avec un Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS) et les PM_{10} avec le Tapered Element Oscillating Microbalance (TEOM), dans un site unique, situé au centre de la ville. Les valeurs utilisées étaient, pour chaque jour, les moyennes, les valeurs minimales et maximales, et la mesure de la pollution intérieure.

Facteurs de confusion pris en compte à l'origine de l'étude par les auteurs : questionnaire portant sur l'habitation, les activités à l'extérieur et à l'intérieur, les expositions à la poussière, aux fumées et sur les habitudes tabagiques. Prises en compte des variables météorologiques.

Résultats – À l'extérieur, la concentration journalière moyenne en nombre pour les PUF était de 10 241(740-60 636) particules/cm³.

Les nombres des PUF à l'intérieur et à l'extérieur étaient significativement corrélés avec des valeurs doubles pour la pollution extérieure par rapport à l'intérieur.

Il n'y avait pas d'association entre les PUF et les différentes variables de santé étudiées. Un certain nombre d'entre elles (diminution de 10 % du DEP au cours de la journée, souffle court, toux) étaient associées avec une augmentation des PM₁₀ de 10 à 20 µg/m³.

7) Augmentation de la prise de médicaments de l'asthme associée aux particules fines et ultra-fines dans l'air (von Klot et coll., 2002).

Lieu et période – Étude menée à Erfurt en Allemagne, entre septembre 1996 et mars 1997.

Population – Cinquante-trois adultes asthmatiques, d'âge moyen 59 ans, non fumeurs, ayant tous un traitement pour asthme, ayant participé à l'étude pendant au moins 30 jours sur la période concernée.

Effets sur la santé recherchés – Chaque jour, sévérité des symptômes et utilisation d'un médicament.

Mesure de l'exposition – Prélèvements en continu dans un seul site, dans la ville, à 50 mètres du trafic routier. Les CN des particules ultra-fines et fines étaient menées avec un Mobile Aerosol Spectrometer (MAS) pour les particules de 0,01-0,5 µm et avec un Optical Aerosol Laser Spectrometer LAS-X pour les particules de 0,1-2,5 µm. Les PM₁₀ et PM_{2,5} étaient mesurées avec des Harvard Impactors. La concentration massique de la fraction PM_{2,5-10} était obtenue en faisant la différence entre ces deux mesures. Nombre et masse étaient déterminés simultanément. L'estimation de l'exposition tenait aussi compte du temps passé hors de la zone géographique étudiée.

Facteurs de confusion pris en compte à l'origine de l'étude par les auteurs : température et humidité ; temps passé hors de la zone géographique étudiée.

Résultats – Les CN moyennes journalières des différentes catégories de particules étaient les suivantes (en particules/cm³) :

CN_{0,01-0,1} : 17 300 (3 272-46 195)

CN_{0,1-0,5} : 2 005 (291-6 700)

CN_{0,5-2,5} : 21,4 (0,9-127,6)

Les expositions cumulées sur 14 jours en particules ultra-fines et fines étaient associées avec la prise de corticoïdes pour soulager l'asthme. L'utilisation de β-agonistes, un autre

traitement des crises d'asthme, était associée à la moyenne sur 5 jours de la concentration en nombre des particules 0,01-0,1 μm et avec la concentration massique des particules 0,01-2,5 μm . La prévalence des symptômes d'asthme était associée avec les concentrations de particules atmosphériques. Les résultats suggèrent que la prise de médicaments pour l'asthme et les symptômes augmentent avec la pollution de l'air en particules.

| Morbidité cardiovasculaire

Après avoir étudié les effets respiratoires de la pollution particulaire, les épidémiologistes se sont intéressés à leurs effets cardiovasculaires. Deux des publications à ce sujet font partie de l'étude ULTRA. Ce projet de recherche européen, qui se déroulait en parallèle à Amsterdam (Pays-Bas), à Erfurt (Allemagne) et à Helsinki (Finlande) en 1996-1997, avait pour premier objectif de permettre des comparaisons entre les appareils de prélèvement des particules. La seconde partie du projet était de réaliser trois études de panel dans les trois mêmes villes, au cours de l'hiver et du printemps 1998-1999.

1) Pollution atmosphérique particulaire et risque de sous-décalage du segment ST pendant des épreuves d'effort submaximales répétées chez des sujets coronariens – Exposition et évaluation du risque pour les particules fines et ultra-fines (étude ULTRA ; Pekkanen et coll., 2002).

Lieu et période – L'étude s'est déroulée à Helsinki (Finlande) pendant une période de six mois en 1998/1999.

Population – Quarante-cinq adultes, âgés de plus de 50 ans, avec une coronaropathie (atteinte cardiaque) stable, non fumeurs et vivant dans un rayon de 5 kilomètres autour du centre de surveillance de la qualité de l'air ont été inclus dans l'étude.

Effets sur la santé recherchés – Deux visites médicales hebdomadaires et un journal quotidien portant sur les symptômes. Pour chaque sujet, les visites étaient programmées le même jour de la semaine et à la même heure et ne s'accompagnaient d'aucun changement de traitement. Au cours de chaque visite médicale, un exercice submaximal de 6 minutes sur une bicyclette ergométrique était réalisé afin de détecter des anomalies cardiaques survenant à l'effort. Si des douleurs cardiaques de type angine de poitrine, des symptômes respiratoires ou bien un épisode fébrile survenaient lors de la semaine précédant la visite, le test d'effort n'était pas réalisé. L'existence d'un trouble de la repolarisation du myocarde (sous-décalage du segment ST par rapport à la ligne de base observable sur l'électrocardiogramme), qui traduit une souffrance du tissu cardiaque, a été choisi comme indicateur d'effet.

Mesure de l'exposition – Les concentrations en nombre (CN) des PUF et des particules du mode accumulation ont été mesurées en continu dans un site central fixe avec un

appareil Electric Aerosol Spectrometer (EAS). Pour les $PM_{2,5}$ et PM_{10} , les Harvard Impactors étaient utilisés. Les résultats des mesures des PM_{10} provenaient de la ville de Helsinki.

Facteurs de confusion pris en compte à l'origine de l'étude par les auteurs : température moyenne et humidité relative.

Résultats – La concentration journalière moyenne en nombre pour les particules de taille 0,01-0,1 μm était de 14 890 par cm^3 (maximum : 50 310 particules/ cm^3).

Pendant les 342 tests d'efforts effectués, 72 sous-décalages du segment ST supérieurs à 0,1 mV ont été observés. Les niveaux de la pollution particulaire 2 jours avant le test d'effort sont significativement associés à l'augmentation du risque de sous-décalage du segment ST pendant l'exercice. L'association est plus cohérente avec les mesures des particules du mode accumulation (OR : 3,29 ; IC95 : 1,57-6,92 pour la $CN_{0,1-1}$ et OR : 2,84 ; IC95 : 1,42-5,66 pour $PM_{2,5}$), mais les PUF aussi ont un effet (OR : 3,14 ; IC95 : 1,56-6,32), lequel est indépendant de celui des $PM_{2,5}$. Aucune association n'a été mise en évidence avec les PM_{10} . Les associations observées tendent à s'accroître chez les sujets qui ne prennent pas de β -bloquants, médicaments utilisés pour soulager le muscle cardiaque.

Note. Cette étude, incluse dans l'ensemble ULTRA (voir ci-après) a été faite à la même époque à Amsterdam (Pays-Bas), Erfurt (Allemagne) et Helsinki (Finlande). En raison du nombre très bas de sous-décalage de segment ST à Amsterdam et à Erfurt, ces résultats se limitent à Helsinki.

2) Effets des particules fines et ultra-fines sur les symptômes cardiorespiratoires chez les gens âgés ayant une coronaropathie – Étude ULTRA (de Hartog et coll., 2003)

Lieu et période – Cette étude, réalisée à Amsterdam (Pays-Bas), Erfurt (Allemagne) et Helsinki (Finlande), a porté sur 6 mois (hiver 1998/1999).

Population – Cent trente et un sujets (40 femmes et 91 hommes) âgés de plus de 50 ans, non fumeurs, ayant une maladie coronarienne récente (moins de trois mois) non compliquée.

Effets sur la santé recherchés – Visite médicale deux fois par semaine, recueil des symptômes cardiorespiratoires journaliers.

Mesure de l'exposition – Mesures quotidiennes des concentrations pondérales des particules de type PM_{10} , et $PM_{2,5}$ avec des Harvard Impactors, des concentrations en nombre (CN) des PUF ($CN_{0,01-0,1}$) avec un compteur à noyaux de condensation et polluants gazeux.

Facteurs de confusion pris en compte à l'origine de l'étude par les auteurs : température, humidité et pression atmosphérique.

Résultats – La concentration journalière moyenne en nombre pour les particules de taille 0,01-0,1 μm était de 17 309 (5 699-37 195) particules/ cm^3 à Amsterdam, de

21 228 (3 867-96 678) particules/cm³ à Erfurt et de 17 078 (2 305-50 306) particules/cm³ à Helsinki.

Pour la relation entre symptômes et pollution de l'air, ajustée sur les infections respiratoires et les variables météorologiques, les odds ratios (OR) étaient assez homogènes entre les trois centres. Aucune association n'a été trouvée entre pollution et douleur thoracique. Une augmentation de 10 µg/m³ pour les PM_{2,5} était positivement associée à l'incidence de la dyspnée (OR = 1,12 ; IC95 : 1,02-1,24) et au fait d'éviter les activités (OR : 1,09 ; IC95 : 0,97-1,22). CN_{0,01-0,1} était seulement associée avec la prévalence de la diminution d'activité (OR = 1,10 ; IC95 : 1,01-1,19). La conclusion de cette étude était que les PM_{2,5} étaient associées à quelques symptômes cardiaques dans les trois groupes de personnes âgées, et qu'elles étaient plus fortement liées à des symptômes cardiorespiratoires que ne l'étaient les PUF.

Synthèse

Dans les grandes cohortes, les risques relatifs (RR) en rapport avec l'exposition aux particules atmosphériques sont très proches de l'unité, l'excès de risque individuel paraît donc faible. Il faut toutefois avoir à l'esprit que la pollution particulaire concerne l'ensemble de la population ; par conséquent, même avec un excès de risque individuel faible, un nombre élevé de personnes peut finalement être touché. Cette pollution particulaire urbaine peut apparaître comme un faible risque par rapport à d'autres risques directement liés aux comportements des populations, tels que le tabac. Cependant, il ne faut pas oublier que cette pollution touche particulièrement des personnes sensibles comme les personnes âgées, les enfants ou les personnes des milieux défavorisés sur le plan socio-économique (Krewski et coll., 2003), qui se concentrent dans des zones d'habitation polluées.

Les résultats actuels des études de panel concernant la morbidité respiratoire, menées chez des asthmatiques, suggèrent l'existence d'effets négatifs sur la santé tels que diminution des paramètres fonctionnels respiratoires et augmentation des symptômes et des médications. Les effets des PUF sont parfois importants (Peters et coll., 1997 ; Penttinen et coll., 2001) et ceci alors que les modèles d'analyse utilisés permettent de tenir compte des facteurs environnementaux (température et hygrométrie, qui ont aussi une action sur la santé). Dans d'autres études, les fractions particulaires plus grossières sont aussi associées à des effets (Pekkanen et coll., 1997 ; Osunsanya et coll., 2001), mais le nombre d'études prenant en compte les PUF est encore trop limité pour conclure à un effet plus ou moins important selon la fraction particulaire. De plus, il est possible que les effets diffèrent non seulement en fonction de la taille des particules mais aussi en fonction de leur composition et des co-expositions (polluants gazeux notamment), et que leurs latences soient différentes.

Sur le plan cardiovasculaire, les PUF sont associées à la survenue d'anomalies cardiaques (sous-décalage du segment ST) chez des sujets coronariens (Pekkanen et coll., 2002). Elles semblent avoir peu d'effet sur les symptômes, mais le petit nombre de travaux ne permet pas de conclure.

Les résultats de la seule étude de mortalité disponible montrent que la mortalité augmente aussi avec les concentrations en particules fines et ultra-fines. Les décès par causes respiratoires semblent survenir plus immédiatement que les décès par causes cardiovasculaires. Aucun élément ne permet toutefois de conclure s'il s'agit de décès anticipés, décès prématurés de sujets qui seraient morts dans les jours suivants du fait de leur mauvais état de santé préalable à l'augmentation de la pollution particulaire, ou de décès supplémentaires. Les particules fines auraient un effet un peu plus important immédiatement (0-1 jour) et les PUF un effet retardé (4-5 jours). Cette observation, si elle est confirmée par d'autres travaux, est en faveur de voies d'action différentes des PUF par rapport aux particules de plus grandes tailles. Ces différences pourraient porter par exemple sur l'absorption respiratoire, la diffusion dans les compartiments de l'organisme, le métabolisme cellulaire ou encore sur la nature des sites effecteurs.

Au total, la littérature épidémiologique disponible actuellement suggère que les PUF ont des effets sur la santé, effets qui s'ajoutent à ceux des particules fines. Elle ne fournit cependant pas d'éléments suffisamment solides pour conclure en termes de lien de causalité entre les effets observés et l'exposition aux PUF : les relations doses-réponses sont fragmentaires, portent sur des atteintes de nature différente, les hypothèses biologiques méritent encore d'être étayées. De plus, les études ne sont pas toujours concordantes. Les données actuelles ne permettent pas non plus de conclure à l'existence ou non d'un seuil d'effet. Pour les particules environnementales de plus gros diamètres, les résultats convergent en faveur de l'absence de seuil d'effet. L'existence possible de voies d'action différentes pour les PUF ne permet cependant pas d'extrapoler ces résultats au cas des PUF.

Ce type de synthèse repose sur un nombre très limité d'études récentes car les techniques de mesure des PUF n'étaient jusqu'à présent pas disponibles pour une utilisation de terrain dans le cadre d'investigations épidémiologiques. Il faut noter que les méthodes d'analyse sur des séries chronologiques nécessitent des compétences très poussées et spécifiques, différentes des techniques employées habituellement en épidémiologie, ce qui explique le nombre limité d'équipes aptes à intervenir. Il est vraisemblable que ce type de recherche va se développer dans les prochaines années et ainsi améliorer les connaissances à ce sujet.

La transposition au milieu professionnel de ces résultats portant sur des pollutions urbaines, pour lesquelles les sources des PUF peuvent être très différentes, paraît hasardeuse. Des études spécifiques en milieu professionnel, qui associeraient des mesures de concentration prenant en compte le nombre, la masse et la surface à une caractérisation chimique des aérosols, seraient nécessaires pour préciser les risques professionnels liés aux PUF.

Bibliographie

- Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Lawrence Beeson W, Yang JX (1999). Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in non-smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **159**, 373-382.
- Ackermann-Lieblich U, Leuenberger P, Schwartz J, Schindler C, Monn C, Bolognini G, Bongard JP, Brandli O, Domenighetti G, Elsasser S, Grize L, Karrer W, Keller R, Keller-Wossidlo H, Kunzli N, Martin BW, Medici TC, Perruchoud AP, Schoni MH, Tschopp JM, Villiger B, Wuthrich B, Zellweger JP, Zemp E (1997). Lung function and long term exposure to air pollutants in Switzerland. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 122-129.
- Clancy L, Goodman P, Sinclair H, Dockery DW (2002). Effect of air-pollution control on death rates in Dublin, Ireland: an intervention study. *Lancet* **360**, 1210-1214.
- Desqueyroux H, Momas I (1999). Pollution atmosphérique et santé, une synthèse des études longitudinales de panel publiées de 1987 à 1998. *Rev Epidem Santé Publ* **47**, 361-375.
- Dockery DW, Pope CA, Xu XP, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG Jr, Speizer FE (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* **329**, 1753-1759.
- Dockery DW, Cunningham J, Damokosh AL, Neas LM, Spengler JD, Koutrakis P, Ware JH, Raizenne M, Speizer FE (1996). Health effects of acid aerosols on North American Children, respiratory symptoms. *Environ Health Perspect* **104**, 500-505.
- de Hartog J.J, Hoek G, Peters A, Timonen KL, Ibal-Mulli A, Brunekreef B, Heinrich J, Tiittanen P, Van Wijnen JH, Kreyling W, Kulmala M, Pekkanen J (2003). Effects of fine and ultrafine particles on cardio-respiratory symptoms in elderly subjects with coronary heart disease: the ULTRA study. *Am J Epidemiol* **157**, 613-623.
- HEI (2003). HEI particle epidemiology reanalysis project. Revised analyses of time-series of air pollution and health. Health Effects Institut, Cambridge, MA.
- Heinrich J, Hölscher B, Frye C C, Meyer I, Pitz M, Cyrys J, Wjst M, Neas L, Wichmann HE (2002). Improved air quality in reunified Germany and decreases in respiratory symptoms. *Epidemiol* **13**, 394-401.
- Heinrich J, Hölscher B, Wichmann HE (2000). Decline of ambient air pollution and respiratory symptoms in children. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1930-1936.
- Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S (2002). Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands, a cohort study. *Lancet* **360**, 1203-1209.
- Krewski D, Burnett RT, Goldberg MS (2000). Reanalysis of the Harvard Six Cities Study and The American Cancer Society Study of particulate air pollution and mortality. Health Effects Institut, Cambridge, MA.
- Krewski D, Burnett RT, Goldberg MS, Hoover BK, Siemiatycki J, Jerrett M, Abrahamowicz M, White WH (2003). Overview of the reanalysis of the Harvard Six Cities Study and American Cancer Society Study of particulate air pollution and mortality. *J Toxicol Environ Health* **66**, 1507-0551.
- Leonardi GS, Houthuijs D, Steerenberg PA, Fletcher T, Armstrong B, Antova T, Lochman I, Lochmanova A, Rudnai P, Erdei E, Musial J, Jazwicz-Kanyion B, Niciu EM, Durbaca S, Fabianova E, Koppova K, Lebret E, Brunekreef B, van Loveren H (2000). Immune biomarkers in relation to exposure to particulate matter, a cross-sectional survey in 17 cities of Central Europe. *Inhal Toxicol* **12 (Suppl. 4)** 1-14.

- Lipfert FW, Zhang J, Wyzga RE (2000). Infant mortality and air pollution, a comprehensive analysis of U.S. data for 1990. *J Air Waste Manag Assoc* **50**, 1350-1366.
- McDonnell WF, Nishino-Ishikawa N, Petersen FF, Chen LH, Abbey D (2000). Relationship of mortality with the fine and coarse fractions of long-term ambient PM₁₀ concentrations in non smokers. *J Expos Anal Environ Epidemiol* **10**, 427-436.
- Osunsanya T, Prescott G, Seaton A (2001). Acute respiratory effects of particles, mass or number. *Occup Environ Med* **58**, 154-159.
- Pekkanen J, Timonen KL, Ruuskanen J, Reponen A, Mirme A (1997). Effects of ultrafine and fine particles in urban air on peak expiratory flow among children with asthmatic symptoms. *Environ Res* **74**, 24-33.
- Pekkanen J, Peters A, Hoek G (2002). Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease, the exposure and risk assessment for fine and ultrafine particles in ambient air (ULTRA) study. *Circulation* **106**, 933-938.
- Penttinen P, Timonen KL, Tittanen P (2001). Number concentration and size of particles in urban air, effects on spirometric lung function in adult asthmatic subjects. *Environ Health Perspect* **109**, 319-323.
- Penttinen P, Timonen KL, Tittanen P, Mirme A, Ruuskanen J, Pekkanen J (2001). Ultrafine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics. *Eur Respir J* **17**, 428-435.
- Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 1376-1383.
- Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J Am Med Assoc* **287**, 1132-1141.
- Pope CA, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW Jr. (1995) Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 669-674.
- Schwartz J, Dockery DW, Neas LM, Wypij D, Ware JH, Spengler JD, Koutrakis P, Speizer FE, Ferris BG Jr. (1994). Acute effects of summer air pollution on respiratory symptoms reporting in children. *Am J Respir Crit Care Med* **150**, 1234-1242.
- Tiittanen P, Timonen KL, Ruuskanen J, Mirme A, Pekkanen J (1999). Fine particulate air pollution, resuspended road dust and respiratory health among symptomatic children. *Eur Respir J* **13**(2) 266-273.
- von Klot S, Wölke G, Tuch T, Heinrich J, Dockery DW, Schwartz J, Kreyling WG, Wichmann HE, Peters A (2002). Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles. *Eur Respir J* **20**, 691-702.
- Wichmann HE, Spix C, Tuch T, Wölke G, Peters A, Heinrich J, Kreyling WG, Heyder J (2000). Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany. Part I, role of particle number and particle mass. HEI Report. Cambridge, MA, **98**, 1-96.
- WHO (2003). Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. Report on a WHO Working Group, Bonn, Germany, 13-15 January 2003. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.

Annexe – Tableaux de synthèse

Référence Lieu et période	PUF Moyennes par jour	Groupe étudié	Effets recherchés	Résultats
Peters et coll. (1997) Erfurt (Allemagne) Octobre 1991- mars 1992	CN : 11 230 (920-39 650) CP : 0,6	27 adultes asthmati- ques non fumeurs	Symptômes respiratoires. DEP 3 fois par jour	Exposition aux PF et PUF associée à une diminution faible du DEP et à une aug- mentation de toux et sensation de malaise. Effets plus fortement associés au nombre de parti- cules des 5 jours précédents.
Pekkanen et coll. (1997) Kuopio (Finlande) Février-avril 1994 (57 jours)	CN _{0,001-0,032} : 29 131 CN _{0,032-0,1} : 15 200	39 enfants (7-12 ans) asthmati- ques	DEP matin et soir	Tous les types de particules sont associés à une dimi- nution du DEP le matin, mais moins les PUF que les PM ₁₀ .
Tiittanen et coll. (1999) Kuopio (Finlande) Printemps 1995 (6 semaines)	CN : 14 700 (6 980- 40 200)	49 enfants (8-13 ans) avec symp- tômes res- piratoires chroniques	DEP matin et soir	Pas d'association entre CN de PUF et DEP.
Penttinen et coll. (2001) Helsinki (Finlande) Novembre 1996-avril 1997	CN : 14 500 (3 700- 46 500)	54 adultes asthmati- ques non fumeurs	Symptômes et prise de médicaments DEP 3 fois par jour	CN en PUF associée négativement avec DEP. Pas d'association avec symptômes et prise de médica- ments.
Penttinen et coll. (2001) Helsinki (Finlande) Novembre 1996-avril 1997	CN : 14 500 (3 700- 46 500)	54 adultes asthmati- ques non fumeurs	Symptômes et prise de médicaments DEP 3 fois par jour, spiromé- trie 2 fois par semaine	CN en PUF associée négativement avec DEP et surtout le DEP de la spiro- métrie.

Morbidité respiratoire – Études de panel

Osunsanya et coll. (2001) Aberdeen (Écosse) hiver 1998-1999	CN : 10 241 (740-60 636)	44 adultes de plus de 50 ans avec obstruction bronchique	Symptômes et prise de médicaments DEP matin et soir	Pas d'association entre CN des PUF et symptômes et DEP
von Klot et coll. (2002) Erfurt (Allemagne) Novembre 1996-mars 1997 (57 jours)	CN : 17 300 (3 272-46 195)	53 asthmatiques de plus de 59 ans, traités pour l'asthme	Symptômes et prise de médicaments	Expositions cumulées sur 14 jours (PF et PUF) associées à la prise de corticoïdes. Utilisation de β -agonistes associée à CN sur 5 jours des PUF.

Morbidité respiratoire - Études de panel (suite)

Référence - Lieu et période	PUF Moyennes par jour	Groupe étudié	Effets recherchés	Résultats
Pekkanen et coll. (2002) Helsinki (Finlande) Hiver 1998-1999, 6 mois.	14 890 (max : 50 310)	45 coronariens stables, âgés de plus de 50 ans, non fumeurs	Symptômes. Test d'effort sous-maximal 2 fois par semaine	Risque de sous-décalage de ST associé à CN en PUF.
De Hartog et coll. (2002) Amsterdam (Pays-bas), Erfurt (Allemagne) et Helsinki (Finlande) Hiver 1998-1999, 6 mois.	17 309 (5 699-37 195) 21 228 (3 867-96 678) 17 078 (2 305-50 306)	131 coronariens récents, âgés de plus de 50 ans, non fumeurs	Symptômes cardio-respiratoires.	CN des PUF associée à la prévalence de la diminution de l'activité physique.

Morbidité cardiovasculaire - Études de panel

CN : concentration en nombre (particules par cm^3)

CP concentration pondérale ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)

PF : particules fines

PUF : particules ultra-fines

3. Données humaines en conditions d'exposition contrôlée

S. Binet

3.1. Contexte

Les études épidémiologiques ont montré que l'exposition aux particules de l'air ambiant était associée à une augmentation de la morbidité respiratoire et cardiovasculaire et de la mortalité, notamment chez les personnes fragiles : asthmatiques, sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou de maladies cardiovasculaires (voir partie précédente). Il n'existe cependant pas de consensus sur les influences respectives des différents paramètres de l'exposition (physiques et chimiques) dans les réponses pathologiques.

Des études épidémiologiques d'expositions contrôlées sont nécessaires pour clarifier l'influence sur les effets observés des différentes classes granulométriques des PM_{10} (concentration massique de particules de diamètre aérodynamique médian inférieur à $10\text{ }\mu\text{m}$, exprimée en $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Les PM_{10} comprennent trois catégories de particules (indices gravimétriques) : $PM_{10-2,5}$ (grossières), $PM_{2,5}$ (fines) et $PM_{0,1}$ (ultra-fines, PUF). Ces particules diffèrent par leurs origines (telluriques, diesels...), leurs caractéristiques chimiques (génération d'espèces activées de l'oxygène...), leurs caractéristiques de dépôt pulmonaire et leur surface totale pour une masse donnée. Ces deux derniers paramètres sont particulièrement importants lorsque l'on considère les PUF (Lippmann et Ito, 2000), d'autant qu'elles sont ubiquitaires dans l'air ambiant et proviennent de nombreuses sources naturelles ou artificielles.

L'hypothèse que sous-tend cette catégorisation est que les effets des PUF sur la santé seraient plus étroitement influencés par leur nombre que par leur proportion massique dans l'aérosol : les PUF ont une contribution massique très minoritaire dans l'indice PM_{10} mais, pour une masse donnée, leur nombre est beaucoup plus important. Peters et coll. (1997) ont montré que, dans un échantillon d'atmosphère et pour l'intervalle $0,01$ à $2,5\text{ }\mu\text{m}$, 73 % du nombre de particules appartenait à la fraction $PM_{0,1}$ tandis que 82 % de la masse appartenait à la fraction $PM_{0,1-0,5}$. Le paramètre surface particulaire totale est ainsi susceptible de constituer un élément prépondérant dans l'expression de la toxicité potentielle de cette fraction. Les études chez l'animal ont montré que l'exposition à de fortes concentrations de PUF occasionnait des lésions pulmonaires (Oberdörster et coll., 1992, 1995). Chez l'homme, pour un échantillon de 27 asthmatiques exposés à l'air ambiant, l'étude de Peters et coll. (1997) a montré que les effets sur la santé étaient associés avec les PUF (exprimées en nombre) plutôt qu'avec les particules fines (exprimées en masse ; voir partie précédente).

Au total, deux questions sont actuellement débattues : 1) ces particules sont-elles capables de causer des effets néfastes ? et, dans l'affirmative : 2) quels sont les mécanismes impliqués (Jaques et Kim, 2000) ? Les mécanismes biologiques à l'origine de la morbidité et de la mortalité associées à l'exposition aux aérosols n'ont pas été, à ce jour, clairement identifiés. Pour les effets cardiovasculaires, Frampton (2001) a proposé une séquence physiopathologique débutant par une atteinte des cellules épithéliales pulmonaires, due à des espèces réactives de l'oxygène, suivie par une synthèse de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules. Cette synthèse initie une succession d'interactions cellulaires et d'événements biochimiques au niveau vasculaire, créant une hypercoagulabilité (augmentation du risque de formation de thrombus).

Une partie de ces questions peut recevoir des éléments de réponse grâce aux études d'exposition contrôlée chez l'homme. Ce type d'études permet la maîtrise des paramètres de l'exposition ainsi que la comparaison avec une population témoin recevant un air purifié. Les essais croisés sont souvent utilisés : il s'agit d'un essai clinique comparatif dans lequel tous les sujets passent par les mêmes périodes de traitement. L'essai croisé est dit randomisé lorsque l'ordre des périodes de traitement est tiré au sort pour chaque sujet. Chaque sujet est ainsi son propre témoin, ce qui permet de limiter l'effet des différences interindividuelles. Néanmoins, selon Ghio et coll. (2000), ce type d'études ne permet pas d'éviter certains biais liés au sujet (exposition préalable non contrôlée à une atmosphère contaminée en PUF) ou certains facteurs confondants liés aux techniques de génération d'atmosphères (difficulté d'obtenir des atmosphères concentrées en particules et représentatives de l'atmosphère ambiante).

Les études d'expositions contrôlées réalisées chez l'homme et décrites ci-après comprennent des études de dosimétrie et des essais cliniques.

D'une part, les études de dosimétrie permettent d'explorer :

- les dépôts pulmonaires des PUF inhalées par des sujets sains, des sujets atteints de BPCO ou d'asthme, au repos ou à l'effort (voir chapitre 3, point 1) ;
- la localisation des dépôts des PUF au niveau de trois zones anatomiques : les voies aériennes supérieures (comprenant l'oropharynx et le larynx), l'arbre trachéobronchique et la partie alvéolaire ;
- la clairance mucociliaire, mécanisme par lequel les particules inhalées sont redirigées hors des poumons et potentiellement réabsorbées par voie digestive ;
- la translocation dans les circuits sanguins ou lymphatiques (et, de là, dans d'autres organes, tels que foie ou rate) des particules insolubles inhalées de petites tailles (voir chapitre 3, point 2) ;
- d'éventuelles différences liées au sexe.

D'autre part, les essais cliniques ont pour objet de rechercher et de comprendre les effets inflammatoires associés à l'inhalation de PUF tels que : fumées d'oxyde de zinc et d'oxyde de magnésium, concentrats de particules ambiantes, échappement de diesels, particules de carbone ultra-fines.

3.2. Études de dosimétrie

Lors de l'inhalation, les particules atmosphériques entrent dans les voies respiratoires et sont transportées plus ou moins profondément dans le poumon. Le dépôt d'une particule dépend de sa masse, de sa taille et de sa forme. On distingue plusieurs types de mécanismes de dépôt en fonction du diamètre aérodynamique (D_{ae}) de la particule (voir chapitre 3, point 1.3.1 ; Miller, 2000). Il existe peu de données sur le dépôt respiratoire des PUF chez l'homme ; or ces informations sont importantes pour prévoir et interpréter les données toxicologiques. Jusque vers la fin des années 1990, ces études présentaient des limitations, n'incluant qu'un faible nombre de sujets, n'intégrant pas les deux sexes, avec des variations dans la distribution granulométrique et la substance composant l'aérosol, et dans les méthodes de mesurage du dépôt pulmonaire. De plus, s'il existe de nombreuses données sur les caractéristiques de dépôt des particules de taille supérieure à 1 μm , elles ne sont pas transposables aux PUF du fait de la différence dans les mécanismes de dépôt. Enfin, des modèles mathématiques de prévision de dépôt en fonction du diamètre aérodynamique (D_{ae}) ont été proposés et plusieurs publications citées ci-après s'y réfèrent pour vérifier leur validité pour les PUF.

3.2.1. Dépôt pulmonaire des PUF chez des sujets sains

Jaques et Kim (2000) ont réalisé une étude exhaustive des taux de dépôt pulmonaire d'un aérosol monodispersé chez des sujets sains des deux sexes. Quatre classes granulométriques ont été générées, dont le diamètre moyen en nombre (DMN) était de 40, 60, 80 ou 100 nm. Les sujets ont été testés au repos dans plusieurs situations qui différaient par le volume courant (V_c : quantité inhalée et exhalée durant 1 cycle respiratoire ; de 500, 750 ou 1 000 ml) et par le débit respiratoire (Q ; de 150 à 500 ml/s). La fraction déposée a été calculée à partir de la différence pour chaque sujet entre les nombres totaux de particules inhalées et exhalées.

Un extrait des résultats de cette étude est présenté dans les tableaux 4.III et 4.IV, ci-après. Le tableau 4.III illustre le fait que la fraction totale déposée (TDF) augmente pour un même volume courant en fonction inverse de la taille des particules et du débit respiratoire.

DMN (nm)	TDF (Vc = 500 ml)	
	Q = 150 ml/s	Q = 250 ml/s
40	0,53	0,44
60	0,44	0,35
80	0,40	0,30
100	0,34	0,26

Tableau 4.III. Fraction totale déposée (TDF) en fonction du diamètre médian en nombre (DMN), pour un volume courant de 500 ml. D'après Jaques et Kim (2000).

Vc (ml)	Q (ml/s)	TDF (hommes+femmes)	TDF (hommes)	TDF (femmes)
500	150	0,53	0,50 ± 0,07	0,56 ± 0,06*
	250	0,44	0,41 ± 0,07	0,47 ± 0,06*
750	250	0,59	0,56 ± 0,06	0,64 ± 0,06*
	375	0,52	0,49 ± 0,06	0,56 ± 0,07
1000	250	0,66	0,64 ± 0,04	0,68 ± 0,07*
	500	0,54	0,53 ± 0,04	0,56 ± 0,08

Tableau 4.IV. Fraction totale déposée (TDF) en fonction du volume courant (Vc) et du débit (Q) pour un diamètre médian en nombre de 40 nm. D'après Jaques et Kim (2000).

(*) Différences significatives entre hommes et femmes

Le tableau 4.IV montre :

- que la fraction totale déposée (TDF) pour une même classe granulométrique (ex. présenté : 40 nm) augmente directement avec le volume courant pour un même débit respiratoire ;
- qu'il existe des différences significatives (*) entre hommes et femmes (dans cette étude, uniquement pour la classe 40 nm).

Les objectifs des travaux de Daigle et coll. (2003) étaient d'estimer le dépôt d'un aérosol ultra-fin de particules de carbone (7,5-75 nm) chez des sujets des deux sexes, au repos et à l'effort, afin de tester la précision des modèles de prédiction de dépôt pour les PUF. Pour les sujets au repos, la fraction déposée variait de 0,55 (56,2–75,0 nm) à 0,80 (7,5-10 nm). Ces résultats confirment, pour des classes granulométriques plus fines, les résultats de Jaques et Kim (2000) sur le lien inversement proportionnel entre la taille des particules et la fraction déposée, mais ne confirment pas l'existence de différences liées

au sexe. Une seconde série d'expériences avec des sujets au repos ou soumis à un effort montrait que la fraction déposée augmentait à l'effort, jusqu'à atteindre 0,94 pour les particules les plus fines. Les auteurs estimaient que, à l'effort, ces données expérimentales étaient supérieures aux données prédites par les modèles.

3.2.2. Dépôt pulmonaire des PUF chez des sujets malades

L'évaluation comparée des dépôts pulmonaires chez des sujets sains et malades est susceptible d'expliquer, au moins pour partie, les différences de risque observées entre ces populations lors des expositions environnementales. Les deux études suivantes portent sur les caractéristiques des dépôts pulmonaires des PUF chez des sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou d'asthme. En effet, des études épidémiologiques ont montré que ces deux populations présentaient un risque de mortalité et de morbidité accru lors de pics de pollution atmosphérique.

Brown et coll. (2002) ont étudié le dépôt et la clairance d'un aérosol ultra-fin de carbone marqué au ^{99}Tc chez des sujets sains et des patients atteints de BPCO (bronchite, emphysème), des deux sexes et au repos. Le diamètre médian en nombre des particules était de 33 nm. La rétention des particules était suivie pendant les deux heures suivant l'exposition, et à 24 h. Le niveau de dose, calculé pour une exposition à un aérosol de $10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$, était significativement plus élevé chez les patients atteints de BPCO. Le dépôt était modérément mais significativement augmenté dans le groupe BPCO. Aucune différence de rétention au temps 24 h ($85 \pm 8\%$) n'a été montrée entre les deux groupes. Au total, les auteurs suggéraient que les patients atteints d'une BPCO modérée ou sévère recevaient une dose de PUF supérieure à celle de sujets en bonne santé.

Chalupa et coll. (2004) ont exploré le dépôt de PUF chez des patients des deux sexes présentant un asthme léger à modéré. Ces derniers ont été exposés durant 2 heures à des PUF de carbone de 7,5 à 75 nm pour un diamètre médian en nombre de 23 nm. Les dépôts ont été mesurés au repos et à l'effort. La fraction déposée augmentait de façon inversement proportionnelle à la taille des particules, atteignant 0,84 au repos et 0,93 pendant l'effort pour la classe 7,5-10,0 nm. Aucune différence entre les sexes n'a été objectivée. Cette étude tend à montrer que les modèles sous-estiment les fractions déposées pour des sujets soumis à un aérosol ultra-fin pendant l'effort. Enfin, et dans les mêmes conditions de repos, la comparaison avec les résultats sur des sujets sains d'une étude précédente de la même équipe (Daigle et coll., 2003) montrait que le dépôt respiratoire des PUF était plus élevé chez les patients asthmatiques (0,76 contre 0,65).

3.2.3. Localisation des dépôts des PUFs

Les particules inhalées ne se déposent pas uniformément dans les voies respiratoires. Cette disparité, bien connue pour les aérosols polydispersés, existe aussi pour les aérosols monodispersés. Elle est le fait de dépôts préférentiels dans les zones de bifurcation de l'arbre trachéobronchique et pourrait expliquer la localisation bronchique notamment des cancers des fumeurs par rapport aux localisations alvéolaires (Balashazy et coll., 2003). En d'autres termes, certaines zones présentent des concentrations surfaciques élevées en particules, alors que la concentration surfacique pulmonaire totale peut être considérée comme sans danger. La caractérisation de ces zones de concentration, qui peuvent représenter des zones d'initiation d'un processus pathologique, est d'une grande importance pour l'évaluation du danger. Ces différences de dépôt ont été mises en évidence pour les particules fines et les grosses particules (Kim et coll., 1996 ; Kim et Hu, 1998). Ces résultats ne sont pas transposables aux PUF dont le mécanisme de dépôt est la diffusion, alors que les particules plus grosses se déposent par sédimentation ou par impaction inertielle.

Kim et Jaques (2000) ont réalisé une étude sur le dépôt pulmonaire d'un aérosol monodispersé chez des sujets sains des deux sexes. Quatre classes granulométriques ont été utilisées dont les diamètres médians en nombre (DMN) étaient de 40, 60, 80 ou 100 nm. Les sujets ont été testés au repos à volume courant (500 ml) et débit respiratoire (250 ml/s) constants. Afin de calculer la répartition régionale des dépôts, les auteurs ont subdivisé les 500 ml du volume inspiratoire en 10 fractions de 50 ml : le poumon était ainsi divisé en compartiments sériés de volumes égaux. Un système permettait d'injecter 50 ml d'aérosol dans l'un des dix compartiments. Dans le tableau 4.V ci-après, les compartiments ont été regroupés en trois régions anatomiques : les voies aériennes supérieures (< 50 ml), la zone trachéobronchique (50-150 ml) et la partie alvéolaire (> 150 ml). Les dépôts sont exprimés en % ($\pm$ écart-type) de la fraction totale inhalée.

Trois conclusions ont été tirées de cette étude :

- le dépôt des PUF varie en fonction des compartiments, avec un pic dans la zone de transition entre les voies respiratoires et la région alvéolaire (150-200 ml) ;
- les régions proximales reçoivent la plus forte dose par unité de surface : 5 à 7 fois la moyenne pulmonaire ;
- les femmes reçoivent une plus forte dose que les hommes dans les zones de l'oropharynx, du larynx et de l'arbre trachéobronchique.

Hommes (n = 11)	Dae (μm)			
	0,04	0,06	0,08	0,10
Tête (oropharynx et larynx)	$0,4 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,5$	$1,0 \pm 1,9$	$0,2 \pm 0,5$
Trachéobronchique	$15,6 \pm 4,6$	$9,2 \pm 3,8$	$8,2 \pm 3,7$	$5,7 \pm 3,2$
Alvéolaire	$33,1 \pm 2,7$	$27,2 \pm 3,8$	$23,9 \pm 5,6$	$18,2 \pm 6,2$
Total	$49,2 \pm 6,6$	$36,7 \pm 7,2$	$33,1 \pm 9,2$	$24,1 \pm 8,9$

Femmes (n = 11)	Dae (μm)			
	0,04	0,06	0,08	0,10
Tête (oropharynx et larynx)	$2,9 \pm 2,5$	$2,2 \pm 2,3$	$2,0 \pm 2,2$	$0,6 \pm 0,7$
Trachéobronchique	$19,8 \pm 3,4$	$13,6 \pm 2,9$	$9,9 \pm 2,7$	$7,8 \pm 1,8$
Alvéolaire	$32,2 \pm 3,9$	$26,1 \pm 4,1$	$22,7 \pm 4,7$	$19,0 \pm 2,9$
Total	$54,9 \pm 5,9$	$42,3 \pm 6,9$	$34,7 \pm 7,8$	$27,4 \pm 4,1$

Tableaux 4.V. Répartitions pulmonaires des dépôts (hommes et femmes, respectivement) en % de la fraction totale inhalée, en fonction du diamètre aérodynamique des particules. D'après Kim et Jaques (2000).

3.2.4. Clairance mucociliaire et translocation dans le sang de particules insolubles

Après inhalation, les particules déposées sur les surfaces des voies aériennes sont épurées par différents mécanismes. On parle alors de clairance qui est la mesure de la capacité d'un organe à se débarrasser d'une substance (quantité de substance éliminée par unité de temps ; voir chapitre 3, point 2).

À titre d'exemple, on peut citer les travaux de Möller et coll. (2004) qui ont évalué la clairance d'un aérosol monodispersé chez des sujets sains non fumeurs ayant inhalé 100 ml de particules ferromagnétiques d'oxyde de fer ($D_{ae} = 4,2 \mu\text{m}$). La clairance des particules suivait deux phases : une clairance rapide mucociliaire pour 49 ± 9 % des particules avec une demi-vie de $3,0 \pm 1,6$ h, tandis que le reste des particules déposées suivaient une clairance lente avec une demi-vie de 109 ± 78 jours. Les données de ces auteurs montraient que la clairance mucociliaire rapide n'épurait que très incomplètement les bronches, bien que la profondeur de dépôt de l'aérosol soit limitée à la région bronchique. En conséquence, et même en tenant compte du fait qu'une partie des particules épurées lentement provient d'un dépôt alvéolaire, il semble qu'une fraction significative des particules déposées dans les voies aériennes subisse une rétention longue dont l'origine n'est pas connue.

Les résultats expérimentaux, obtenus tant chez l'animal que chez l'homme, ont permis de créer des modèles permettant de prévoir la clairance des particules en fonction de leur Dae et de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la clairance lente (Sturm et Hofmann, 2003) : transfert intracellulaire des particules à travers l'épithélium respiratoire (vers le sang ou les canaux lymphatiques), capture des particules par les macrophages alvéolaires. Pour Hofmann et coll. (2003), le transfert extracellulaire vers le sang serait le mécanisme de clairance le plus probable pour les particules de 1 à 10 nm, tandis que pour celles de 10 à 100 nm, le mécanisme préférentiel serait la capture et l'accumulation dans les cellules épithéliales.

| Translocation de particules inhalées insolubles

Les études épidémiologiques ont montré que l'exposition aux PUF était associée à une augmentation de la morbidité, non seulement respiratoire, mais surtout cardiovasculaire. Les mécanismes responsables des effets cardiovasculaires ne sont pas connus. Plusieurs hypothèses se dégagent à la lecture de la littérature spécialisée :

- l'inflammation pulmonaire entraîne un relargage systémique de cytokines pro-inflammatoires ;
- l'atteinte de la régulation autonome du myocarde induit une variation du rythme cardiaque ;
- le passage (translocation) des PUF dans le système circulatoire exercerait un effet direct sur le cœur et les vaisseaux.

C'est cette dernière hypothèse qu'explore l'étude de Nemmar et coll. (2002), décrite au chapitre 3, point 2, où le lecteur trouvera une présentation plus complète des aspects évoqués ici.

3.3. Essais cliniques (effets inflammatoires dus à l'inhalation de PUF)

Une des hypothèses dérivée des résultats des études expérimentales est que les PUF, du fait de leur très grande surface spécifique, présentent une forte interaction avec les cellules épithéliales bronchiques, conduisant au relargage de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Lundborg et coll., 1999 ; Tran et coll., 2000 ; Jimenez et coll., 2000). Dans une étude plus récente, Dick et coll. (2003) estimaient que les PUF présentes dans la fraction PM₁₀ pouvaient entraîner des effets adverses *via* un stress oxydatif. Ce stress pourrait induire des conséquences chez des sujets susceptibles tels que les asthmatiques ou les sujets atteints d'une BPCO.

Note. Des médiateurs chimiques, en particulier les cytokines « pro-inflammatoires » (comme l'IL-1) et le TNF- α , activent les cellules endothéliales. L'augmentation de l'expression à leur surface de certaines molécules d'adhésion (sélectine, ICAM1, V-CAM) permet l'adhérence des leucocytes. Les leucocytes migrent ainsi de façon spécifique vers le site inflammatoire, car seules les cellules endothéliales activées expriment les molécules d'adhésion responsables du ralentissement des leucocytes puis de leur adhésion.

3.3.1. Fumées d'oxyde de zinc

L'étude de Kushner et coll. (1995) avait pour objet de vérifier si une exposition par inhalation à des PUF d'oxyde de zinc était susceptible de conduire à une réponse inflammatoire dose-dépendante et s'il existait une différence entre fumeurs et non fumeurs. L'étude a été réalisée en aveugle, randomisée et croisée avec, pour les expositions témoins, de l'air de qualité médicale. Les particules primaires (non agrégées) d'oxyde de zinc, générées par le dispositif expérimental, présentaient un diamètre médian compris entre 8 et 40 nm, un diamètre massique moyen de 170 nm et une concentration comprise entre 2,76 et 37,0 mg/m³. Les auteurs concluaient qu'une exposition par inhalation à une fumée d'oxyde de zinc, dont la concentration était considérée comme inférieure à celles trouvées précédemment dans les études de soudage d'aciers galvanisés, provoquait un accroissement dose-dépendant de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-8) ainsi qu'une augmentation des polynucléaires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) collecté 20 heures après l'exposition.

L'étude de Fine et coll. (1997) avait pour objectif d'étudier les effets cliniques d'expositions de 2 heures à 0 (pas d'exposition), $2,52 \pm 0,27$ ou $4,9 \pm 0,4$ mg/m³ en fumées d'oxyde de zinc dont le diamètre médian en masse était de 300 nm. Le dispositif de génération des fumées était similaire à celui de Kushner et coll. (1995). La période de repos entre chaque exposition était de 48 h au minimum, avec un intervalle moyen de 9 jours. Il a été conclu qu'une exposition de 2 h à 5 mg/m³ induisait une fièvre, une myalgie, une toux et une fatigue (pic 9 heures après l'exposition). Concernant les cytokines pro-inflammatoires, l'IL-6 plasmatique était significativement augmentée mais pas le TNF- α .

Ce sujet est présenté de façon plus détaillée au chapitre 5, point 1.

3.3.2. Fumées d'oxyde de magnésium

Les objectifs de l'étude de Kushner et coll. (1997) étaient de caractériser les réponses pulmonaires chez l'homme exposé à des fumées d'oxyde de magnésium afin de vérifier si la « fièvre des métaux » (due à l'oxyde de zinc) relevait d'un effet lié à la composition chimique ou d'une réponse potentiellement générique aux particules d'oxydes métalliques. Les pourcentages massiques des PM_{0,1} et des PM_{1,8} de MgO étaient respectivement

de 28 % et plus de 98,6 %. Les sujets, qui étaient leur propre contrôle, ont été exposés à une concentration comprise entre 5,8 et 230 mg/m³ pendant 15 à 45 minutes. Un intervalle d'au moins 28 jours séparait l'exposition au MgO de l'exposition témoin (air médical). Les essais ont été réalisés 20 h après chaque exposition. Aucune différence n'a été trouvée entre les expositions à MgO et à l'air médical pour les paramètres étudiés dans le LLBA (concentrations en cellules inflammatoires, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) ou dans le sang périphérique (concentration en neutrophiles). S'appuyant sur les différences d'effets entre les expositions à ZnO ou MgO, les auteurs concluaient à l'importance de la composition chimique dans la survenue des effets respiratoires.

3.3.3. Concentrats de particules ambiantes (CAP)

Ghio et coll. (2000) ont recherché chez des volontaires sains l'apparition d'un afflux cellulaire inflammatoire après exposition par inhalation à un concentrat de particules de l'air ambiant (CAP). Le dispositif de concentration utilisé (Harvard/US-EPA), qui rejette les particules de diamètre supérieur à 2,5 μ m, permet de réaliser des atmosphères de particules six à dix fois plus concentrées que l'air ambiant pour l'intervalle 0,1-2,5 μ m. Les PM_{0,1} ne sont pas concentrées par ce dispositif. Trois groupes ont été exposés au CAP pendant deux heures à des concentrations comprises entre 23 et 311 μ g/m³. Il ne s'agissait pas, au sens strict, d'une étude d'expérimentation contrôlée puisque les atmosphères différaient en fonction des groupes : l'air ambiant, pris au même endroit mais à des temps différents, ne présentait pas la même composition en PM_{2,5}. En particulier, le diamètre aérodynamique moyen en masse était compris entre 0,54 et 0,72 μ m. Le groupe témoin a été exposé à de l'air purifié. Les sujets exposés n'ont noté aucun symptôme et leur fonction pulmonaire n'était pas altérée. Dix-huit heures après l'exposition, l'analyse du LLBA montrait une légère augmentation des neutrophiles dans les fractions bronchique et alvéolaire pour le groupe exposé à la plus forte concentration. L'analyse sanguine montrait une augmentation significative du taux de fibrinogène. Les auteurs concluaient que les particules de l'air ambiant étaient capables d'induire une légère inflammation du tractus respiratoire profond ainsi qu'une augmentation du fibrinogène sanguin.

Holgate et coll. (2003a), utilisant le concentrateur de l'EPA, ont réalisé des atmosphères de CAP (PM_{2,5-0,15}) de concentrations comprises entre 23,1 et 311,1 μ g/m³. Les sujets témoins étaient exposés à l'air ambiant, contenant une concentration moyenne de 2,9 μ g/m³ en PM_{2,5}. Les sujets exposés durant deux heures ont été répartis en trois groupes de concentrations moyennes différentes : basse ($m = 47,2 \mu\text{g/m}^3$), intermédiaire ($m = 107,4 \mu\text{g/m}^3$) et haute ($m = 206,7 \mu\text{g/m}^3$). Les Dae moyens en masse (MMAD) de chaque groupe étaient respectivement de : 0,54 μ m, 0,67 μ m et 0,72 μ m. La fonction pulmonaire, explorée par spirométrie et pléthysmographie, n'a pas été modifiée par l'exposition aux CAP. Le fibrinogène plasmatique était légèrement

augmenté, sans relation effet-dose. L'analyse du LLBA montrait une augmentation dose-dépendante du taux de neutrophiles, significative pour le groupe le plus exposé. Les biopsies bronchiques n'ont pas montré de différences entre témoins et exposés (cellules inflammatoires, molécules d'adhésion, lymphocytes T). Les auteurs concluaient à un modeste degré d'inflammation sur la base des résultats du LLBA, mais notaient que cet effet n'était pas reflété dans les tissus biopsiques des bronches proximales. Deux interprétations ont été proposées pour ce résultat contradictoire : soit l'effet inflammatoire intervenait dans des voies plus distales, soit les processus responsables n'avaient pas été explorés dans cette étude.

3.3.4. Particules diesels

Les particules des fumées émises par les moteurs diesels sont très fines et peuvent s'agréger, donnant ainsi naissance à des tailles de particules comprises entre 20 et 200 nm (Sawyer et Johnson, 1995, cité par Salvi et coll., 1999).

Dans l'étude menée par Salvi et coll. (1999), les expositions ont été standardisées à 300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en PM_{10} pendant une heure. Les auteurs n'ont pas constaté de variation de la fonction pulmonaire ; en revanche, une augmentation significative a été constatée pour les neutrophiles dans le lavage bronchique proximal et pour les lymphocytes B, la fibronectine et l'histamine dans le LLBA. Dans les biopsies bronchiques obtenues six heures après l'exposition, les paramètres suivants étaient significativement augmentés : neutrophiles, mastocytes, lymphocytes T (CD4^+ et CD8^+), molécules d'adhésion. Dans le sang périphérique, une augmentation significative des neutrophiles et des plaquettes était observée. Au total, les auteurs concluaient à une réponse inflammatoire pulmonaire et systémique marquée, et suggéraient que cette réponse était sous-estimée dans les mesures standards de la fonction pulmonaire.

Une seconde étude de Salvi et coll. (2000) avait pour objet de tester l'hypothèse selon laquelle les réponses inflammatoires objectivées dans l'étude de 1999 étaient médiées par une augmentation de la synthèse de chimiokines et de cytokines par les cellules résidentes des biopsies bronchiques et du LLBA. Le dispositif de génération et les conditions d'exposition étaient les mêmes que dans l'étude précédente, et chaque sujet était exposé à l'air ou aux fumées de diesels avec un intervalle d'au moins trois semaines. L'étude a montré qu'une exposition brève augmentait les niveaux d'expression d'ARNm des chimiokines inflammatoires IL-8 et le GRO- α (*growth-regulated oncogene-alpha*), dont le rôle majeur est d'attirer et d'activer les leucocytes : IL-8 dans les biopsies et le LLBA ; et IL-8 et GRO- α de l'épithélium bronchique.

Nightingale et coll. (2000) ont étudié chez des volontaires sains la réponse inflammatoire relative à une exposition à des particules d'échappement de moteur diesel (PED). Il s'agissait d'une étude croisée, randomisée et en double aveugle. Les expositions

témoins étaient réalisées avec de l'air purifié. Les expositions aux PED duraient deux heures dans une atmosphère contenant $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de particules PM_{10} . Quatre-vingt-cinq pour cent en masse des PED étaient inférieurs à $1,1 \mu\text{m}$; le diamètre volumique moyen était de $0,72 \mu\text{m}$. Les auteurs n'ont pas constaté de variations des paramètres cardiovasculaires ou de la fonction pulmonaire. Les concentrations de monoxyde de carbone (CO) dans l'air expiré augmentaient significativement et atteignaient un maximum une heure après l'exposition aux PED. Ils ont constaté aussi une augmentation des neutrophiles et de la myéloperoxydase dans les crachats induits. Les concentrations en marqueurs de l'inflammation (IL-6, TNF- α , P-sélectine) dans le sang périphérique n'étaient pas modifiées. En conclusion, cette étude montrait qu'une exposition à de fortes concentrations en PED induisait une réponse inflammatoire des voies aériennes.

Les sujets asthmatiques présentent une inflammation des voies aériennes et sont cliniquement plus sensibles aux polluants atmosphériques. Le protocole de l'étude de Holgate et coll. (2003b) a été construit pour vérifier si la sensibilité aux fumées diesels était explicable par une inflammation neutrophile aiguë ou par une augmentation de l'inflammation allergique des voies respiratoires. L'étude de type croisée, randomisée et en double aveugle, comportait des sujets sains et des sujets présentant un asthme atopique modéré, exposés durant deux heures soit à de l'air filtré, soit à un aérosol de $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de particules diesels. Les sujets témoins et asthmatiques ont montré une augmentation modérée mais significative de la résistance des voies aériennes immédiatement après l'exposition aux PED. Chez les sujets sains, cette augmentation de la résistance était associée à un accroissement du nombre de neutrophiles dans le liquide de lavage bronchique ainsi qu'à une augmentation des lymphocytes dans le LLBA. Dans ce même groupe, les biopsies bronchiques ont montré une augmentation des expressions de la P-sélectine (molécule d'adhésion endothéliale) et de l'IL-8 et, dans le LLBA, une augmentation de l'IL-8. Aucune autre différence significative n'a été montrée dans le liquide de lavage bronchique ou dans le LLBA (protéines totales, albumine, marqueurs inflammatoires solubles). Chez les sujets asthmatiques, le seul effet observé résultant de l'exposition à l'aérosol était une augmentation significative de l'IL-10 dans les tissus pulmonaires (effet anti-inflammatoire). En conclusion, les auteurs ont estimé que la susceptibilité des asthmatiques aux fumées diesels n'était pas due directement à l'induction d'une inflammation de type neutrophiles ou, indirectement, à une aggravation de l'inflammation préexistante des voies respiratoires.

3.3.5. PUF de carbone

Pietropaoli et coll. (2004) ont décrit les résultats de quatre études contrôlées, randomisées, croisées et en double aveugle dans lesquelles chaque sujet, asthmatique modéré ou sain, a été exposé à l'air filtré et à un aérosol de PUF de carbone (diamètre médian en nombre = 23-28 nm) pendant deux heures avec 2 à 3 semaines de repos entre deux

séances d'exposition. Les sujets sains ont été exposés à 10, 25 et 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et les asthmatiques à 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Aucune différence n'a été montrée chez les sujets sains ou asthmatiques exposés à 10 ou 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les paramètres de fonction pulmonaire ou d'inflammation des voies respiratoires. En revanche, les auteurs ont observé, 21 heures après l'exposition de sujets sains à la plus haute concentration (50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), une réduction du débit expiratoire maximal médian et de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone. Ces réductions étaient temporaires et réversibles, puisqu'elles n'étaient plus observées lors des tests effectués 45 heures après l'exposition. Cette étude démontre que l'inhalation de PUF de carbone n'induit que peu de modification de la fonction pulmonaire chez des sujets sains et asthmatiques.

3.4. Discussion et conclusion

L'avantage essentiel des études d'expositions contrôlées résulte de leur possibilité de sélectionner, contrôler et quantifier les expositions aux polluants pour des sujets dont le statut clinique est connu et de caractériser la survenue d'effets dans des conditions expérimentales idéales (Utell et Frampton, 2000). Cependant, ces études présentent des limitations importantes pour des raisons pratiques et éthiques. Elles sont limitées à des petits groupes de sujets susceptibles de présenter une grande diversité interindividuelle dans les réponses à une exposition donnée et à des courtes périodes d'exposition. Les techniques de mesures choisies doivent être les moins invasives possibles et les concentrations en polluants ne doivent produire que des réponses bénignes et temporaires. Enfin, les tentatives de prédiction des effets chroniques sur la santé à partir de réponses aiguës transitoires manquent de validation scientifique.

Les études de dosimétrie chez l'homme ont permis de mieux préciser les caractéristiques du dépôt des particules dans l'arbre pulmonaire. Du fait de l'hétérogénéité de la structure des poumons et des types cellulaires qui les composent, l'endroit dans lequel les particules se déposent conditionne leurs vitesses de clairance ainsi que la nature et l'importance des effets biologiques. En 1994, l'International Commission on Radiological Protection (ICRP) a proposé un modèle informatique de dépôt des particules dans le tractus respiratoire humain. Ce modèle montrait des différences significatives dans le dépôt des PUF en fonction des régions du tractus respiratoire (tableau 4.VI).

D'autres auteurs ont amélioré ce modèle (Bolch et coll., 2001 ; Sturm et Hofmann, 2005 ; voir chapitre 3, point 1). Globalement, les résultats des essais cliniques de dosimétrie sont cohérents avec les résultats du modèle de l'ICRP :

- le dépôt des PUF augmente de façon inversement proportionnelle à la taille des particules : la proportion déposée après inhalation au repos d'un aérosol monodispersé est de 26 à 34 % pour un aérosol de particules de 100 nm et de 44 à 55 % pour un aérosol de 50 nm (Jaques et Kim, 2000) ;

Taille des PUFs	Régions anatomiques		
	Nez, pharynx, larynx	Trachéobronchique	Alvéolaire
1 nm	90	10	-
5-10 nm	20-30	20-30	20-30
20 nm	10	10	> 50
100 nm	5	5	20

Tableau 4.VI. Pourcentages de dépôts dans les voies respiratoires, d'après la Commission internationale de protection radiologique (ICRP, 1994).

- les PUF se déposent dans toutes les régions des voies aériennes et des poumons mais principalement dans les bronchioles et les alvéoles respiratoires (Kim et Jaques, 2000).

Le dépôt pulmonaire chez les sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive ou d'asthme est modérément mais significativement plus important que celui observé chez des sujets sains comme le montrent les études de Brown et coll. (2002) et Chalupa et coll. (2004).

La recherche d'un effet lié au sexe pour certaines de ces études fournit des résultats contradictoires, et nécessiterait des études complémentaires. D'après Kim et Jaques (2000), les femmes reçoivent une plus forte dose que les hommes dans les zones oropharynx-larynx et trachéobronchique. Pour Jaques et Kim (2000), il existe une différence significative entre hommes et femmes sur la fraction totale déposée (TDF) mais uniquement pour la classe 40 nm. D'autres auteurs n'ont observé aucune différence liée au sexe dans les dépôts (Daigle et coll., 2003 ; Chalupa et coll., 2004).

Holgate et coll. (2003a), confirmant les résultats de Salvi et coll. (1999), ont trouvé une augmentation faible mais statistiquement significative de la résistance bronchique (légère constriction) chez les sujets sains et asthmatiques immédiatement après une exposition de deux heures aux PED. Cette résistance n'était pas associée à une variation significative de la CVF (capacité vitale forcée) ou du VEMS (volume maximal expiré en une seconde).

La plupart des particules, en particulier les plus petites, ne s'arrêtent pas au tissu pulmonaire mais sont déplacées vers la plèvre ou transportées par le système sanguin vers d'autres organes, dans lesquels ils déclenchent des réactions locales. Les données de transfert des PUF de l'épithélium pulmonaire vers le système sanguin sont contradictoires. L'étude de Nemmar et coll. (2002), par ailleurs contestée, fournit à ce titre des indications sur la probabilité de transfert de PUF de carbone marquées du poumon vers le foie par voie sanguine. Ce transfert est aussi mis en avant par les auteurs pour expliquer les effets cardiovasculaires résultant d'une exposition aux PUF. La couche de

mucus protégeant les voies aériennes s'amincit à l'extrémité distale des bronchioles terminales. Il est ainsi probable que les particules déposées dans les acini (bronchioles et alvéoles respiratoires) soient internalisées par les macrophages et les cellules épithéliales. Le contact et la capture des PUF par les cellules épithéliales interviennent probablement dans l'ensemble du tractus respiratoire, mais avec une plus grande fréquence dans la région acinaire du fait de l'absence de mucus.

Quand les particules entrent dans les alvéoles, les poumons se comportent comme d'autres organes et réagissent à leur présence en développant une inflammation modérée, dont la chronicité est susceptible de conduire à une granulomatose, une fibrose voire un cancer. Pour résumer les résultats des études présentées :

- les fumées d'oxyde de magnésium et les aérosols de particules de carbone n'ont entraîné aucune réponse inflammatoire chez les sujets sains exposés ;
- les fumées d'oxyde de zinc, les particules d'air ambiant concentrées et les fumées de diesel ont provoqué une inflammation caractérisée par une infiltration de neutrophiles dans les voies respiratoires, sans modification du taux de protéines totales ou d'albumine dans les liquides de lavage bronchique indiquant une absence de lésion de ces voies.

D'autres marqueurs de l'inflammation ont été explorés, mais les résultats ne paraissent pas cohérents. On peut cependant signaler que plusieurs études notent une augmentation de la synthèse de l'interleukine IL-8 (cytokine pro-inflammatoire) et une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion de l'endothélium vasculaire expliquant l'infiltration des neutrophiles (par exemple P-sélectine dans les biopsies bronchiques). Enfin, l'étude de Holgate et coll. (2003b) chez les sujets asthmatiques a montré que la susceptibilité des asthmatiques aux fumées diesels n'était pas due à l'induction d'une inflammation de type neutrophile ou à une aggravation de l'inflammation préexistante des voies respiratoires ; le seul effet observé était une augmentation significative de l'IL-10 dans les tissus pulmonaires qui inhibe l'expression de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-8. Les auteurs s'attendaient en fait à ce que les asthmatiques expriment une plus grande variabilité dans les paramètres inflammatoires par rapport aux sujets sains, puisque les résultats des études épidémiologiques avaient montré une association entre l'augmentation de la symptomatologie asthmatique et l'augmentation de la pollution atmosphérique. Ce résultat, qui reste à confirmer, pourrait être dû au fait que l'inflammation chez les asthmatiques suit un mécanisme différent de celui des sujets sains, ou que l'exposition ait été insuffisante. On notera cependant que les patients asthmatiques recrutés présentaient une grande variabilité de leurs paramètres inflammatoires par comparaison avec les sujets sains. Ceci a pu affaiblir la probabilité d'obtenir des résultats significatifs dans cette étude.

En conclusion, les études d'expositions contrôlées chez l'homme sont d'une grande importance pour interpréter les données de morbidité issues des études épidémiologiques

et pour affiner les modèles informatiques de prévision des dépôts. Il serait souhaitable que les études futures s'attachent en particulier à mieux comprendre les mécanismes à l'origine des effets inflammatoires dans les populations à risque, à confirmer l'existence d'un effet lié au sexe et à évaluer la translocation des PUF des poumons vers d'autres organes. Ces approches devront requérir une collaboration plus étroite entre les épidémiologistes, les chercheurs qui ont en charge les études cliniques, et les toxicologues responsables des études expérimentales chez l'animal.

Bibliographie

- Balashazy I, Hofmann W, Heistracher T (2003). Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer. *J Appl Physiol* **94**, 1719-1725.
- Bolch WE, Farfan EB, Huh C, Huston TE (2001). Influences of parameter uncertainties within the ICRP 66 respiratory tract model: particle deposition. *Health Physics* **81**, 378-394.
- Brown JS, Zeman KL, Bennett WD (2002). Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med* **166**, 1240-1247.
- Burch WM (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans: Comment on Nemmar et al (2002) and author reply. *Circulation* **106**, e141-142.
- Chalupa DC, Morrow PE, Oberdorster G, Utell MJ, Frampton MW (2004). Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ Health Perspect* **112**, 879-882.
- Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, Frampton MW (2003). Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhalation Toxicology* **15**, 539-552.
- Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol*, **15**, 39-52.
- Fine JM, Gordon T, Chen LC, Kinney P, Falcone G, Beckett WS (1997). Metal fume fever: characterization of clinical and plasma IL-6 responses in controlled human exposures to zinc oxide fume at and below the threshold limit value. *J Occup Environ Med* **39**, 722-726.
- Frampton MW (2001). Systemic and cardiovascular effects of airway injury and inflammation: ultrafine particle exposure in humans. *Environ Health Perspect* **109** (Suppl. 4), 529-532.
- Ghio AJ, Kim C, Devlin RB (2000). Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 981-988.
- Hofmann W, Sturm R, Winkler-Heil R, Pawlak E (2003). Stochastic model of ultrafine particle deposition and clearance in the human respiratory tract. *Radiat Prot Dosimetry* **105**, 77-80.
- Holgate ST, Devlin RB, Wilson SJ, Frew AJ (2003a). Health Effects of Acute Exposure to Air Pollution. Part II: Healthy Subjects Exposed to Concentrated Ambient Particles. Health Effects Institute, Research Report 112, pp 31-50.
- Holgate ST, Sandström T, Frew AJ, Stenfors N, Nördenhall C, Salvi S, Blomberg A, Helleday R, Södenberg M (2003b). Health effects of acute exposure to air pollution. Part I: Healthy and asthmatic subjects exposed to diesel exhaust. Health Effects Institute, Research Report 112, pp 1-29.
- ICRP (1994). Human respiratory tract model for radiological protection. *Ann. ICRP* **24** (1-3). International Commission on Radiological Protection, publication 66. Pergamon Press, Oxford.

- Jaques PA, Kim CS (2000). Measurement of total lung deposition of inhaled ultrafine particles in healthy men and women. *Inhal Toxicol* **12**, 715-731.
- Jimenez LA, Thompson J, Brown DA, Rahman I, Antonicelli F, Duffin R, Drost EM, Hay RT, Donaldson K, MacNee W (2000). Activation of NF-kappaB by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation. *Toxicol Appl Pharmacol* **166** 101-110.
- Kim CS, Hu SC (1998). Regional deposition of inhaled particles in human lungs: comparison between men and women. *J Appl Physiol* **84**, 1834-1844.
- Kim CS, Hu SC, DeWitt P, Gerrity TR (1996). Assessment of regional deposition of inhaled particles in human lungs by serial bolus delivery method. *J Appl Physiol* **81**, 2203-2213.
- Kim CS, Jaques PA (2000). Respiratory dose of inhaled ultrafine particles in healthy adults. *Philosophical Transactions. Math Phys Engin Sci* **358**, 2693-2705.
- Kuschner WG, d'Alessandro A, Wintermeyer SF, Wong H, Boushey HA, Blanc PD (1995). Pulmonary responses to purified zinc oxide fume. *J Investig Med* **43**, 371-378.
- Kuschner WG, Wong H, d'Alessandro A, Quinlan P, Blanc PD (1997). Human pulmonary responses to experimental inhalation of high concentration fine and ultrafine magnesium oxide particles. *Environ Health Perspect* **105**, 1234-1237.
- Lippmann M, Ito K (2000). Contributions that epidemiological studies can make to the search for a mechanistic basis for the health effects of ultrafine and larger particles. *Philosophical Transactions: Math Phys Eng Sci* **358**, 2787-2797.
- Lundborg M, Johansson A, Lastbom L, Camner P (1999). Ingested aggregates of ultrafine carbon particles and interferon-gamma impair rat alveolar macrophage function. *Environ Res* **81**, 309-315.
- Miller FJ (2000). Dosimetry of particles: critical factors having risk. Assessment implications. *Inhal Toxicol* **12**, 389-395.
- Möller W, Haussinger K, Winkler-Heil R, Stahlhofen W, Meyer T, Hofmann W, Heyder J (2004). Mucociliary and long-term particle clearance in the airways of healthy nonsmoker subjects. *J Appl Physiol* **97**, 2200-2206.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**, 411-414.
- Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P, Donnelly LE, Rogers DF, Kinnersley R, Fan Chung K, Barnes PJ, Ashmore M, Newman-Taylor A (2000). Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 161-166.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193-199.
- Oberdörster G, Gelein RM, Ferin J, Weiss B (1995). Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles ? *Inhal Toxicol* **7**, 111-124.
- Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 1376-1383.
- Pietropaoli AP, Frampton MW, Hyde RW, Morrow PE, Oberdorster G, Cox C, Speers DM, Frasier LM, Chalupa DC, Huang LS, Utell MJ (2004). Pulmonary function, diffusing capacity, and inflammation in healthy and asthmatic subjects exposed to ultrafine particles. *Inhal Toxicol* **16**, 59-72.

- Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, Frew A (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.
- Salvi SS, Nordenhall C, Blomberg A, Rudell B, Pourazar J, Kelly FJ, Wilson S, Sandstrom T, Holgate ST, Frew AJ (2000). Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO-alpha production in healthy human airways. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 550-557.
- Sawyer RF, Johnson JH (1995). Diesel emissions and control technology. In: Diesel Exhaust: A Critical Analysis of Emissions, Exposure and Health Effects. A Special Report on the Institute's diesel Working Group. Health Effects Institute, Cambridge, MA. 66-81.
- Sturm R, Hofmann W (2003). Mechanistic interpretation of the slow bronchial clearance phase. *Radiat Prot Dosimetry* **105**, 101-104.
- Sturm R, Hofmann W (2005). 3D-Visualization of particle deposition patterns in the human lung generated by Monte Carlo modeling: methodology and applications. *Comput Biol Med* **35**, 41-56.
- Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD, Donaldson K (2000). Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal Toxicol* **12**, 1113-1126.
- Uttel MJ, Frampton MW (2000). Toxicologic methods: controlled human exposures. *Environ Health Perspect* **108**, 605-613.

4. Pollution particulaire environnementale, particules ultra-fines et cancer

B. Hervé-Bazin

Cette question, ancienne (par exemple Stocks et Campbell, 1955 ; Carnow, 1978), reste posée par des études environnementales récentes. Dockery et coll. (1993) ont ainsi relevé un lien statistiquement significatif et robuste entre exposition à la pollution particulaire environnementale (notamment particules fines) et mortalité par cancer pulmonaire dans six villes des États-Unis, après correction pour la consommation de tabac (RR = 1,26 ; IC95 : 1,08-1,47) ; ceci a été confirmé par des données complémentaires, qui mettaient en avant le rôle éventuel des PM_{2,5} (Pope et coll., 2002). La présence de multiples substances cancérogènes dans les pollutions urbaines, auxquelles une partie non négligeable de la population est exposée depuis son enfance, n'est sans doute pas totalement étrangère à de telles observations (Knox, 2005 ; Nafstad et coll., 2003). Cette complexité défie toujours l'identification d'agents causaux (Harrison et coll., 2004) ou des mécanismes biologiques impliqués (Knaapen et coll., 2004).

Samet et coll. (2004) se sont interrogés, dans la revue *Science*, sur de possibles mutations génétiques héréditaires induites par la pollution particulaire environnementale. Ils écrivent : « Les données épidémiologiques établissent des corrélations entre les niveaux de pollution particulaire et une liste croissante d'effets sur la santé. Somers et coll.

(2004) ont étendu ces observations en montrant la présence de modifications génétiques sur cellules germinales de la souris mâle. En suivant les modifications de longueur de séquences non codantes d'ADN, ces auteurs ont montré que la descendance de souris exposées à une atmosphère industrielle présentait un taux accru de mutations présumées, et que ces modifications génétiques étaient transmises par la lignée paternelle. Or le taux de mutation était réduit d'environ 50 % après filtration de l'air par un filtre à haute efficacité, ce qui indique que des agents liés aux particules, ou les particules elles-mêmes, sont responsables des mutations observées. Ces observations complètent une série de recherches initiées par l'observation que des goélands argentés de ce site industriel présentaient un taux de modifications de minisatellites de l'ADN supérieur à ceux en sites ruraux (Yauk et coll., 1996). Une expérimentation complémentaire avait montré l'induction de modifications de l'ADN dans la descendance de souris maintenues en air industriel pollué, par comparaison avec des souris maintenues en site moins pollué (Somers et coll., 2002). On pourrait donc supposer une succession d'événements, partant d'une pollution particulière environnementale à activité mutagène et se terminant par des modifications possiblement héréditaires du patrimoine génétique. Mais une telle séquence demeure incomplète. »

Pour Vineis et Husgafvel-Pursiainen (2005), ces données doivent être interprétées avec prudence, les mécanismes susceptibles d'induire des mutations sur cellules germinales étant multiples.

La question posée ci-dessus par Samet et coll. (2004) n'est pas seulement justifiée par des données animales. Par exemple, Perera et coll. (2002), confirmant de nombreux travaux (parmi lesquels Perera et coll., 1999 ; Whyatt et coll., 2001), ont observé des dommages à l'ADN (adduits d'HPA et mutations du gène HPRT) chez des mères exposées à une pollution industrielle ($n = 67$, région de Cracovie) et leurs nouveau-nés ($n = 64$; $p = 0,03$, après correction pour le tabac, l'alimentation et le statut socio-économique). Les niveaux des adduits étaient plus élevés chez ces derniers, indiquant une susceptibilité plus grande du fœtus. Les auteurs considèrent avoir démontré un lien moléculaire entre une mutation somatique chez le nouveau-né et une exposition transplacentaire à la pollution environnementale. Ces travaux ont été étendus à différentes populations (Perera et coll., 2005 ; les auteurs estiment que les fœtus pourraient être 10 fois plus sensible aux atteintes à l'ADN que leurs mères) ; ils ne sont pas le fait d'une seule équipe : une revue de la littérature (Neri et coll., 2006) a recensé 188 publications sur ce thème (49 ont été retenues pour une méta-analyse).

Vineis et Husgafvel-Pursiainen (2005) ont présenté une synthèse des études liant pollution atmosphérique et cancer pulmonaire, et une revue de celles relatives aux marqueurs biologiques dans la population humaine. Selon eux, « Des études prospectives montrent que la pollution atmosphérique accroît probablement le risque de cancer pulmonaire. Aux États-Unis ont été étudiés les effets du smog sur 6 338 adventistes vivant en Californie, suivis de 1977 à 1992 (étude dite « ASHMOG », Beeson et coll., 1998 ; McDonnell et

coll., 1999), la mortalité de 8 111 habitants dans 6 villes, suivis de 1974 à 1989 (Dockery et coll., 1993), et la mortalité d'environ 500 000 adultes suivis de 1982 à 1998 (société américaine contre le cancer, Pope et coll., 2002). Ces études indiquent un accroissement du risque de cancer pulmonaire avec la pollution urbaine, notamment PM_{10} et $PM_{2,5}$. (...) La première étude de cohorte européenne a été menée sur 120 852 adultes habitant 204 villes des Pays-Bas, petites ou grandes (Hoek et coll., 2002) ; une deuxième étude relative à l'incidence du cancer pulmonaire a été réalisée en Norvège sur 16 209 hommes vivant à Oslo (Nafstad et coll., 2003). Ces études ont également trouvé un risque accru de cancer pulmonaire d'environ 10 % pour une augmentation de $10 \mu g/m^3$ de NO_x . »

Ces réflexions sont confortées par des études d'indicateurs biologiques d'exposition, « qui permettent une meilleure évaluation de l'exposition, une meilleure compréhension des mécanismes, et une approche de la question des susceptibilités individuelles. »

« Un large corpus de tests *in vitro* a évalué l'activité mutagène de la pollution atmosphérique ou de ses principaux composants (revu par Claxton, 2004). Les nombreux HPA, présents pratiquement dans tous les mélanges complexes issus de la combustion, y sont une source importante de génotoxicité, mais certainement pas la seule, puisqu'on y trouve au moins 500 agents mutagènes appartenant à diverses familles chimiques. De plus, d'autres facteurs interviennent, tels que la taille de la particule ou les réactions chimiques atmosphériques.

Les travaux expérimentaux *in vitro* et *in vivo* menés depuis les années 70 ont montré à maintes reprises la toxicité pulmonaire, les effets inflammatoires, la génotoxicité et la cancérogénicité de divers types de pollutions particulières, notamment des émissions diesels, mais aussi de la pollution particulaire urbaine. De nombreux tests acellulaires ou sur cellules en culture ont montré que diverses particules peuvent provoquer des dommages oxydants à l'ADN (revu par Risom et coll., 2005). Des expérimentations *in vivo* avec des particules diesels ont confirmé ces atteintes au niveau pulmonaire chez des rongeurs, à partir de faibles niveaux d'exposition. »

Vineis et Husgafvel-Pursiainen (2005) concluent : « Les grandes études de cohortes américaines et européennes fournissent des motifs raisonnables de craindre que la pollution atmosphérique augmente le risque de cancer pulmonaire, notamment en combinaison avec d'autres facteurs de risque connus, tels que le tabagisme actif ou passif et les expositions professionnelles. Pour ce qui se rapporte aux marqueurs biologiques, même si certains ont permis de mieux comprendre les effets de la pollution atmosphérique, beaucoup d'aspects restent à clarifier, notamment sur leur validité. Les atteintes de l'ADN reflètent certes des expositions à des cancérogènes, mais dépendent aussi de susceptibilités individuelles, héréditaires ou acquises. (...) La génotoxicité de la pollution atmosphérique a été démontrée sans ambiguïté par des travaux *in vitro* et *in vivo*, tant pour des extraits organiques (notamment divers HPA) que pour les particules elles-mêmes. Pour ces dernières, les effets peuvent être directs (dus aux propriétés physico-chimiques) ou indirects (formation d'espèces activées de l'oxygène ou de l'azote par des

cellules inflammatoires). Les données expérimentales, jointes à celles relevant de fréquents dommages à l'ADN des lymphocytes de personnes exposées à l'air urbain pollué, indiquent que la 8-oxo-dG est l'une des lésions promutagènes importantes. »

Ceci n'implique pas qu'il faille confondre PUF et pollution particulaire environnementale. Il est ici fait l'hypothèse que l'exposition vie entière de la population générale à la pollution particulaire environnementale favorise le développement du cancer pulmonaire, dans la mesure où l'on peut faire confiance à la prise en compte de nombreux facteurs de confusion, et en premier lieu du tabagisme. Il est rappelé dans ce contexte que les particules les plus fines de la pollution environnementale, notamment issues de processus de combustion (pollution automobile, chauffage domestique, activités industrielles) – incluant donc des PUF – pourraient, pour différentes raisons (en particulier enrichissement en molécules organiques dont les HPA, et en éléments métalliques), participer à cet effet.

Comme on peut le constater, l'accent est fréquemment mis sur le rôle possible des HPA. Or, s'il est connu que les HPA reconnus cancérigènes sont préférentiellement adsorbés sur les particules les plus fines de la pollution (Sheu et coll., 1997 ; Wu et coll., 2006), leur responsabilité réelle dans la genèse de cancers pulmonaires a été, sur le plan expérimental, plusieurs fois mise en doute (Borm et coll., 2005 ; Nikula et coll., 1995 – voir chapitre 8, point 2). D'autres polluants, par exemple l'ozone, ont été mis en relation avec l'incidence de cancers des voies respiratoires (Pereira et coll., 2005 ; Abbey et coll., 1999), sans pour autant être présentés comme un agent causal.

Il est difficile de s'avancer davantage sur des questions aussi complexes, notamment de généraliser à tout type de PUF : il ne saurait être question d'affirmer sans nuance que toutes les particules ultra-fines sont des cancérigènes pulmonaires potentiels. Il serait préférable, au moins dans un premier temps, de procéder à des examens approfondis de la situation cas par cas, en commençant par les PUF les plus utilisées au plan professionnel et, parmi elles, par celles pour lesquelles les expositions ou les dangers sont les plus marqués.

Bibliographie

Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Lawrence Beeson W, Yang JX (1999). Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* **159**(2) 373-382. Comment in: *Am J Respir Crit Care Med* 1999 Feb, **159**(2) 354-356.

Beeson WL, Abbey DA, Knutsen SF (1998) Long-term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults: results from the AHSMOG study. *Environ Health Perspect* **106**, 813-823.

- Borm PJ, Cakmak G, Jermann E, Weishaupt C, Kempers P, van Schooten FJ, Oberdörster G, Schins RP (2005). Formation of PAH-DNA adducts after *in vivo* and *in vitro* exposure of rats and lung cells to different commercial carbon blacks. *Toxicol Appl Pharmacol* **205**(2) 157-67.
- Carnow BW (1978). The "urban factor" and lung cancer: cigarette smoking or air pollution? *Environ Health Perspect.* **22**, 17-21.
- CIRC (1989). Diesel and gasoline engine exhausts - Diesel engine exhaust (Group 2A); Gasoline engine exhaust (Group 2B). Vol. 46, p. 41.
- CIRC (1996). Carbon black (Group 2B), Vol. 65, p. 149.
- Claxton LD, Matthews PP, Warren SH (2004) The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat Res* **567**, 347-99.
- Dockery DW, Pope CA 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG Jr, Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* **329**(24) 1753-1759. Comments in: *N Engl J Med* 1993 Dec 9; 329(24) 1807-1808. *N Engl J Med* 1994 Apr 28; 330(17) 1237-1238. *N Engl J Med* 2004 Jan 8; 350(2) 198-199.
- Harrison RM, Smith DJT, Kibble AJ (2004). What is responsible for the carcinogenicity of PM_{2.5}? *Occup Environ Med* **61**, 799-805.
- Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, Fischer P, Brandt PA van (2002) Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *The Lancet* **360**, 1203-1209.
- Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer* **109**(6) 799-809.
- Knox EG (2005). Childhood cancers and atmospheric carcinogens. *J Epidemiol Community Health.* **59**(2) 101-105. Comment in: *J Epidemiol Community Health* 59(9) 716-717.
- McDonnell WF, Abbey DE, Nishino N, Lebowitz MD (1999) Long-term ambient ozone concentration and the incidence of asthma in nonsmoking adults: the AHSMOG Study. *Environ Res* **80**, 110-121.
- Nafstad P, Haheim LL, Oftedal B, Gram F, Holme I, Hjermann I, Leren P (2003). Lung cancer and air pollution: a 27 year follow up of 16 209 Norwegian men. *Thorax* **58**(12) 1071-1076. Comment in: *Thorax* 2003 Dec; 58(12) 1010-1012.
- Neri M, Ugolini D, Bonassi S, Fucic A, Holland N, Knudsen LE, Sram RJ, Ceppi M, Bocchini V, Merlo DF (2006). Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat Res* **612**(1) 14-39.
- Nikula KJ, Snipes MB, Barr EB, Griffith WC, Henderson RF, Mauderly JL (1995). Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. *Fundam Appl Toxicol* **25**(1) 80-94.
- Nyberg F, Gustavsson P, Jarup L, Bellander T, Berglind N, Jakobsson R, Pershagen G (2000). Urban air pollution and lung cancer in Stockholm. *Epidemiology* **11**(5) 487-495. Comment in: *Epidemiology* 2000 Sep; 11(5) 485-486. *Epidemiology* 2001 Sep; 12(5) 590-592.
- Pereira FA, de Assuncao JV, Saldiva PH, Pereira LA, Mirra AP, Braga AL (2005). Influence of air pollution on the incidence of respiratory tract neoplasm. *J Air Waste Manag Assoc* **55**(1) 83-87.
- Perera F, Tang D, Whyatt R, Lederman SA, Jedrychowski W (2005). DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from Northern Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**(3) 709-714.

- Perera F, Hemminki K, Jedrychowski W, Whyatt R, Campbell U, Hsu Y, Santella R, Albertini R, O'Neill JP (2002). *In Utero* DNA Damage from Environmental Pollution Is Associated with Somatic Gene Mutation in Newborns. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 1134-1137.
- Perera FP, Jedrychowski W, Rauh V, Whyatt RM (1999). Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environ Health Perspect* **107** (Suppl. 3), 451-460.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J Am Med Assoc* **287**(9) 1132-1141. Comment in: *J Am Med Assoc* 2002 Aug 21, **288**(7) 830.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J Am Med Assoc* **287**(9) 1132-1141. Comment in: *J Am Med Assoc* 2002 Aug 21; 288(7) 830; discussion 830.
- Pope CA 3rd, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW Jr.(1995). Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med* **151**(3 Pt 1) 669-674.
- Risom L, Moller P, Loft S (2005) Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* **592**(1-2) 119-137.
- Samet JM, DeMarini DM, Malling HV (2004). Do airborne particles induce heritable mutations? *Science* (**304**) 971.
- Sheu HL, Lee WJ, Lin SJ, Fang GC, Chang HC, You WC (1997). Particle-bound PAH content in ambient air. *Environ Pollut* **96**(3) 369-382.
- Somers CM, Yauk CL, White PA, Parfett CL, Quinn JS (2002). Air pollution induces heritable DNA mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(25) 15904-15907.
- Somers CM, McCarry BE, Malek F, Quinn JS (2004). Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. *Science* **304**(5673) 1008-1010. Comment in: *Science* 2004 May 14, **304**(5673) 971-972.
- Stocks P, Campbell JM (1955). Lung cancer death rates among non-smokers and pipe and cigarette smokers; an evaluation in relation to air pollution by benzpyrene and other substances. *Br Med J* **4945**, 923-929.
- Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K (2005). Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* **26**(11) 1846-1855.
- Whyatt RM, Jedrychowski W, Hemminki K, Santella RM, Tsai WY, Yang K, Perera FP (2001). Biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA damage and cigarette smoke exposures in paired maternal and newborn blood samples as a measure of differential susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**(6) 581-588.
- Wu SP, Tao S, Liu WX (2006). Particle size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in rural and urban atmosphere of Tianjin, China. *Chemosphere* **62**(3) 357-367.
- Yauk CL, Quinn JS (1996). Multilocus DNA fingerprinting reveals high rate of heritable genetic mutation in herring gulls nesting in an industrialized urban site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22) 12137-121341. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 Dec 22, **95**(26) 15867.

Quelques cas concrets (1) : oxydes simples ou complexes

5

Il a semblé important de présenter l'essentiel de l'information relative à des PUF soit d'occurrence ancienne, soit d'apparition récente (nanotubes de carbone et fullérènes, dans le chapitre suivant). D'une part, l'abord de cas concrets fournit des éléments de réponse à ceux qui peuvent y être confrontés, d'autre part illustre, même si cela entraîne parfois quelques redites, la démarche de recherche d'une compréhension plus globale des phénomènes toxicologiques en jeu. Il est bon de prendre conscience que, si le vocabulaire « nano » et ce qu'il recouvre correspond effectivement à des problématiques nouvelles, la réalité concrète de l'exposition professionnelle à certaines nanoparticules est ancienne, comme le montre la majorité des exemples présentés (la totalité de ce chapitre, mais aussi les noirs de carbone et les particules diesels, dans le chapitre suivant). Il en résulte d'ailleurs, fait souvent oublié, qu'une partie des risques pour la santé présentés par certaines PUF sont repérés, de même qu'il existe un corpus non négligeable en matière de prévention/protection.

Les exemples retenus ont été groupés pour cet ouvrage en deux ensembles qui renvoient, assez globalement, à des paramètres chimiques : oxydes simples ou complexes, d'une part (ce chapitre), particules à base de carbone, d'autre part (chapitre suivant).

1. Oxyde de zinc

D. Lison

L'oxyde de zinc (ZnO), ou calamine, se présente sous la forme de cristaux blancs insolubles dans l'eau mais solubles dans les acides. Il est utilisé comme pigment dans les peintures, comme charge dans les caoutchoucs et pour couvrir certains papiers, notamment en raison de sa capacité à absorber les rayonnements UV. Il trouve également des applications dans les crèmes, lotions et autres produits solaires. Il possède des propriétés piézoélectriques et est luminescent. À l'échelle mondiale, plusieurs milliers de tonnes de ZnO sont produites annuellement.

L'utilisation de poudres plus fines améliore les propriétés techniques de l'oxyde de zinc, en augmentant notamment sa capacité d'absorption des UV, mais également sa surface disponible (jusque plusieurs dizaines de m^2/g) pour catalyser certaines réactions (effets antibactérien, antifongique, adhérence...). En outre, les nanoparticules de ZnO sont transparentes, offrant des avantages notamment pour la préparation de produits cosmétiques comme les crèmes solaires. En laboratoire, des particules ultra-fines de ZnO se sont révélées plus efficaces pour absorber le rayonnement UVA que des particules ultra-fines de TiO_2 ; en outre le ZnO offrait l'avantage d'une moindre blancheur (Pinnell et coll., 2000).

Ces particules nanométriques peuvent être obtenues en vaporisant du zinc métallique en présence d'oxygène ; le refroidissement mène à la nucléation et à la condensation de particules nanocristallines de ZnO. Durant leur production, les particules individuelles ($< 100 \text{ nm}$) forment des agglomérats d'une taille de quelques micromètres qui peuvent facilement être dispersés moyennant des formulations particulières. D'autres procédés, comme la croissance dirigée de nanocristaux en solution, existent également. Ces nanoparticules sont généralement commercialisées sous la forme de poudres sèches, ou de suspensions aqueuses ou organiques (toluène).

Plus récemment, des nanoparticules de ZnO dopées avec de l'aluminium, du cuivre ou de l'argent ont été produites pour des applications en opto-électronique (substrats isolants, diodes laser, photo-détecteurs, etc.).

L'avènement des nanotechnologies et l'arrivée dans les laboratoires et sur les marchés de nouveaux matériaux issus de ces technologies ont soulevé de nombreuses questions quant à leur innocuité pour les consommateurs et pour les salariés exposés durant la production et la commercialisation (The Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2005). Les propriétés physicochimiques particulières des nanomatériaux ont fait craindre, probablement à juste titre, que des propriétés toxiques nouvelles puissent survenir parallèlement, et les toxicologues se trouvent confrontés à un nouveau champ de recherche, où beaucoup semble encore devoir être exploré.

Dans le cas des nanoparticules de ZnO, on dispose de données depuis de nombreuses années : en milieu professionnel, les effets des particules de ZnO de très petite dimension (fumées) ont déjà été étudiés dans les fonderies et chez les soudeurs.

On connaît, en effet, depuis le début du siècle dernier, les manifestations respiratoires et générales, ressemblant à un épisode grippal, qui surviennent chez des salariés exposés de manière aiguë à des fumées d'oxydes métalliques (50 à 500 nm), principalement de ZnO, mais également de CuO et MgO. Ce syndrome est connu sous l'appellation de fièvre des fondeurs ou de *metal fume fever* dans les pays anglo-saxons. Les symptômes surviennent suite à des opérations de soudage, de galvanisation, de fonderie au cours desquelles les opérateurs ont inhalé les fumées émises. Le malaise survient quelques heures après l'exposition et consiste en soif, toux sèche, sécheresse de la gorge, goût métallique, sialorrhée (excès de production de salive), nausées, céphalées, transpiration, fatigue, douleurs dans les membres, douleurs thoraciques et dyspnée sans sibilances. La température dépasse rarement 39 °C et l'on peut noter une augmentation du nombre de globules blancs de type neutrophile ; on parle d'une leucocytose neutrophilique. La première observation de lésions pulmonaires au cours d'un épisode de fièvre des fondeurs a été faite radiologiquement ainsi que par la mise en évidence d'altérations cellulaires du lavage broncho-alvéolaire chez un travailleur allemand (Vogelmeier et coll., 1987).

Dans la forme classique de la fièvre des fondeurs, la radiographie thoracique peut objectiver des opacités discrètes et bilatérales durant la phase aiguë de la maladie (Brown, 1988). Une accumulation de polymorphonucléaires neutrophiles peut être objectivée dans le lavage broncho-alvéolaire (Blanc et coll., 1991) et une excrétion urinaire accrue de Zn confirmera le diagnostic (Kuschner et coll., 1998). La guérison complète après 24 à 48 heures est la règle, et le salarié peut reprendre le travail sans aucun dommage permanent. Quelques observations isolées indiquent que des perturbations marquées des paramètres fonctionnels respiratoires (réduction de la capacité vitale forcée ou CVF et/ou du volume expiratoire maximal en une seconde ou VEMS) peuvent être enregistrées (Malo et coll., 1990 ; Nemery et Demedts, 1991). Deux authentiques cas d'asthme professionnel aux fumées de ZnO ont été rapportés (Malo et coll., 1993). Un cas d'urticaire et d'œdème angiogénique de type Quincke après exposition à des fumées de ZnO a également été rapporté chez un soudeur (Farrell, 1987). Une caractéristique de ce syndrome est qu'en cas d'exposition répétée ou continue, l'organisme développe une tolérance qui disparaît rapidement après une courte période de non-exposition ; typiquement, les salariés sont alors plus sensibles en début de semaine de travail et l'on parle de « fièvre du lundi matin ». Le syndrome est généralement bien connu et toléré des professionnels exposés aux fumées métalliques (par exemple soudeurs). Le traitement est purement symptomatique : repos et analgésiques suffisent à maîtriser la symptomatologie. Historiquement, des traitements incluant de l'huile mentholée et du lait ont été recommandés, mais l'efficacité de ces mesures n'est pas prouvée (Barceloux, 1999).

Des données précises relatives aux concentrations de ZnO susceptibles d'induire une fièvre inhalatoire sont relativement fragmentaires. La TLV-TWA pour les fumées de ZnO est de 5 mg/m³ (10 mg/m³ pour les poussières « totales » de ZnO), la TLV-STEL est de 10 mg/m³ (ACGIH, 2005). En France, la VME est de 5 mg/m³ pour les fumées d'oxyde de zinc (10 mg/m³ pour les poussières de ZnO).

Des études ont été effectuées chez des volontaires pour explorer les mécanismes de la fièvre des fondeurs et tenter de dégager une relation dose-réponse. Dans un premier travail, 14 soudeurs volontaires ont été recrutés pour effectuer des opérations de soudage sur de l'acier galvanisé (77-153 mg Zn/m³), dans des conditions contrôlées (Blanc et coll., 1991). Les auteurs ont principalement observé une élévation du nombre de polymorphonucléaires neutrophiles (mais également des macrophages et des lymphocytes de tous types) dans le lavage broncho-alvéolaire, 22 heures après l'exposition. Ils n'ont détecté que de minimes modifications des paramètres fonctionnels (volumes et débits) et peu ou pas de cytokines impliquées dans l'inflammation (TNF- α et IL-1). Plus tard, la même équipe a montré que la réponse inflammatoire pulmonaire induite par l'inhalation de ZnO (~500 mg de Zn par minute, c'est-à-dire une exposition de par exemple 10 minutes à une atmosphère de 50 mg/m³, soit 10 fois la VME) s'accompagne d'une élévation des taux de TNF- α , d'IL-1 et d'IL-8 (trois cytokines médiatrices de l'inflammation) dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire réalisé 20 heures après l'exposition (Kuschner et coll., 1995) ; la réponse TNF- α apparaît dose-dépendante dans cette étude. On a également montré que l'inflammation pulmonaire (neutrophiles et IL-6 dans le LBA) était significativement moindre chez des sujets chroniquement exposés aux fumées métalliques que chez des sujets naïfs (Fine et coll., 2000).

Parmi des ouvriers exposés à des concentrations de l'ordre de 5 mg/m³ de fumées de ZnO aux environs immédiats d'un fourneau électrothermique, des modifications minimales de la fonction respiratoire ont été mises en évidence par une technique spirométrique classique (réduction du VEMS) ainsi que par la mesure des oscillations forcées ; ces modifications survenaient particulièrement durant les postes nocturnes (Pasker et coll., 1997).

L'inflammation pulmonaire induite par les fumées de ZnO peut être reproduite expérimentalement, par exemple chez le cobaye (Lam et coll., 1985, 1988 ; Conner et coll., 1988). Ainsi, l'inhalation pendant une heure d'une concentration d'environ 1 mg/m³ induit des altérations de la compliance pulmonaire (capacité des poumons à suivre les mouvements de ventilation imprimés par la cage thoracique et les muscles respiratoires) chez le cobaye (Amdur et coll., 1982). Chez la souris exposée de manière répétée à 1 mg/m³ de ZnO, il a été montré que le phénomène de tolérance progressive, tel qu'on l'observe chez les travailleurs, est associé à une surexpression pulmonaire de métallothionéine, une protéine fixant avec une grande affinité le Zn (Wesselkamper et coll., 2001).

Une étude expérimentale a également exploré la sensibilité de quatre espèces (rat, cobaye, lapin et homme) à l'inhalation de fumées d'oxyde de zinc générées en conditions expérimentales (0, 2,5 et 5 mg/m³ de particules de taille médiane de 60 nm en conditions d'inhalation nasale ; Gordon et coll., 1992). Après une exposition de 3 heures à 2,5 ou 5 mg/m³, le rat et le cobaye montraient une réponse inflammatoire dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (cellules totales, protéines, lactico-déshydrogénase et β -glucuronidase). Le lapin se montrait résistant, probablement en raison d'une moindre rétention des particules dans les poumons. Chez l'homme, les quatre volontaires exposés durant 2 heures à une atmosphère de 5 mg/m³ (respiration oro-nasale) développèrent des symptômes classiques de fièvre des fondeurs approximativement 6 à 10 heures plus tard, mais aucune modification des paramètres fonctionnels respiratoires ne fut détectée. Ces données tendent à suggérer que la valeur limite d'exposition actuelle de 5 mg/m³ n'offre pas une protection suffisante. Ceci est corroboré par une étude effectuée chez 13 volontaires sains non préalablement exposés au ZnO, chez qui il a été montré qu'une exposition de 2 heures à 5 mg/m³ de fumées de ZnO induisait une élévation significative de la température corporelle, des symptômes de toux, fatigue et myalgie ainsi qu'un taux sanguin accru d'IL-6 (une cytokine associée à l'inflammation aiguë ; Fine et coll., 1997). Une étude destinée à comparer chez 12 sujets sains les réponses pulmonaires (symptômes, cellularité des expectorations induites), immuno-hématologiques (température orale, formule sanguine, marqueurs inflammatoires et antigènes de surface leucocytaires, hémostase) et cardiovasculaires (rythme cardiaque, tension artérielle, saturation en oxygène, électrocardiogramme) induites par l'inhalation de particules de ZnO ultra-fines (< 0,1 μ m) et submicroniques (0,1-1 μ m) n'a pas objectivé d'effet significatif, quel que soit le type de particules inhalées à raison de 0,5 mg/m³ durant 2 heures (Beckett et coll., 2005). On peut donc déduire de l'ensemble de ces études que la TLV actuelle de 5 mg/m³ est probablement inadaptée et que la concentration sans effet (NOAEL) se situe entre 0,5 et 5 mg/m³.

Quelques études *in vitro* ont permis de préciser les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'inflammation pulmonaire induite par les fumées de ZnO. Ainsi, il a été montré que les ions Zn⁺⁺ et le ZnO stimulaient la production des radicaux oxygénés par les neutrophiles humains (Lindahl et coll., 1998). On a également pu montrer *in vitro* que, dès 3 heures après une exposition au ZnO solubilisé (10⁻³ M, préalablement dissous dans l'acide nitrique et neutralisé), des cellules macrophagiques U937 produisent des quantités accrues de TNF- α et d'IL-8, suggérant que les macrophages alvéolaires sont une source possible de ces médiateurs *in vivo* (Kuschner et coll., 1998). On a également rapporté que la fonction de phagocytose des macrophages alvéolaires recueillis de cobayes exposés *in vivo* à 2,5 ou 5 mg/m³ de ZnO était réduite (Gordon et coll., 1992), mais le rôle de cette anomalie dans la pathogenèse de la fièvre des fondeurs n'est pas connu.

Bibliographie

- ACGIH (2005). Threshold limit values for chemical substances and physical agents and Biological exposure indices.
- Amdur MO, McCarthy JF, Gill MW (1982). Respiratory response of guinea pigs to zinc oxide fume. *Am Ind Hyg Assoc J* **43**, 887-889.
- Barceloux DG (1999). Zinc. *J Toxicol Clin Toxicol* **37**, 279-292.
- Beckett WS, Chalupa DF, Pauly-Brown A, Speers DM, Stewart JC, Frampton MW, Utell MJ, Huang LS, Cox C, Zareba W, Oberdörster G (2005). Comparing Inhaled Ultrafine vs Fine Zinc Oxide Particles in Healthy Adults, A Human Inhalation Study. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 1129-1135.
- Blanc P, Wong H, Bernstein MS, Boushey HA (1991). An experimental human model of metal fume fever. *Ann Intern Med* **114**, 930-936.
- Brown JJ (1988). Zinc fume fever. *Br J Radiol* **61**, 327-329.
- Conner MW, Flood WH, Rogers AE, Amdur MO (1988). Lung injury in guinea pigs caused by multiple exposures to ultrafine zinc oxide, changes in pulmonary lavage fluid. *J Toxicol Environ Health* **25**, 57-69.
- Farrell FJ (1987). Angioedema and urticaria as acute and late phase reactions to zinc fume exposure, with associated metal fume fever-like symptoms. *Am J Ind Med* **12**, 331-337.
- Fine JM, Gordon T, Chen LC, Kinney P, Falcone G, Beckett WS (1997). Metal fume fever, characterization of clinical and plasma IL-6 responses in controlled human exposures to zinc oxide fume at and below the threshold limit value. *J Occup Environ Med* **39**, 722-726.
- Fine JM, Gordon T, Chen LC, Kinney P, Falcone G, Sparer J, Beckett WS (2000). Characterization of clinical tolerance to inhaled zinc oxide in naive subjects and sheet metal workers. *J Occup Environ Med* **42**, 1085-1091.
- Gordon T, Chen LC, Fine JM, Schlesinger RB, Su WY, Kimmel TA, Amdur MO (1992). Pulmonary effects of inhaled zinc oxide in human subjects, guinea pigs, rats, and rabbits. *Am Ind Hyg Assoc J* **53**, 503-509.
- Kuschner WG, d'Alessandro A, Hambleton J, Blanc PD (1998). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 release from U937 human mononuclear cells exposed to zinc oxide in vitro. Mechanistic implications for metal fume fever. *J Occup Environ Med* **40**, 454-459.
- Kuschner WG, d'Alessandro A, Wintermeyer SF, Wong H, Boushey HA, Blanc PD (1995). Pulmonary responses to purified zinc oxide fume. *J Invest Med* **43**, 371-378.
- Lam HF, Chen LC, Ainsworth D, Peoples S, Amdur MO (1988). Pulmonary function of guinea pigs exposed to freshly generated ultrafine zinc oxide with and without spike concentrations. *Am Ind Hyg Assoc J* **49**, 333-341.
- Lam HF, Conner MW, Rogers AE, Fitzgerald S, Amdur MO (1985). Functional and morphologic changes in the lungs of guinea pigs exposed to freshly generated ultrafine zinc oxide. *Toxicol Appl Pharmacol* **78**, 29-38.
- Lindahl M, Leanderson P, Tagesson C (1998). Novel aspect on metal fume fever, zinc stimulates oxygen radical formation in human neutrophils. *Hum Exp Toxicol* **17**, 105-110.
- Malo JL, Cartier A, Dolovich J (1993). Occupational asthma due to zinc. *Eur Respir J* **6**, 447-450.

- Malo JL, Malo J, Cartier A, Dolovich J (1990). Acute lung reaction due to zinc inhalation. *Eur Respir J* **3**, 111-114.
- Nemery B, Demedts M (1991). Respiratory involvement in metal fume fever. *Eur Respir J* **4**, 764-765.
- Pasker HG, Peeters M, Genet P, Clement J, Nemery B, Van de Woestijne KP (1997). Short-term ventilatory effects in workers exposed to fumes containing zinc oxide, comparison of forced oscillation technique with spirometry. *Eur Respir J* **10**, 1523-1529.
- Pinnell SR, Fairhurst D, Gillies R, Mitchnick MA, Kollias N (2000). Microfine zinc oxide is a superior sunscreen ingredient to microfine titanium dioxide. *Dermatol Surg* **26**, 309-314.
- The Royal Society and Royal Academy of Engineering. (2005). Nanoscience and nanotechnologies, opportunities and uncertainties. <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm> (mai 2005).
- Vogelmeier C, König G, Bencze K, Fruhmant G (1987). Pulmonary involvement in zinc fume fever. *Chest* **92**, 946-948.
- Wesselkamper SC, Chen LC, Gordon T (2001). Development of pulmonary tolerance in mice exposed to zinc oxide fumes. *Toxicol Sci* **60**, 144-151.

2. Dioxyde de titane

B. Hervé-Bazin

Ce chapitre résume d'abord la toxicologie pulmonaire, uniquement chez l'homme, du TiO_2 « classique », dont les particules ont généralement une taille supérieure à 1 μm . Une seconde partie présente les données, animales et humaines, relatives aux PUF de TiO_2 étudiées seules ou en comparaison avec d'autres tailles (TiO_2 ou non). Celles relatives à une éventuelle pénétration cutanée de PUF de TiO_2 figurent chapitre 3, point 3.

Il a semblé intéressant ici d'examiner les particularités toxicologiques propres aux PUF d'une substance qui a longtemps été dite de faible toxicité, voire « inerte », et utilisée à ce titre dans nombre d'études expérimentales. De ce fait, TiO_2 est l'une des rares substances minérales pour lesquelles on dispose d'assez nombreuses données.

TiO_2 existe sous plusieurs formes allotropiques (notamment anatase ou rutil, pour les formes cristallines). Il est semi-conducteur et l'absorption d'une lumière de longueur d'onde inférieure à environ 385 nm (UVA ou UVB) provoque la formation d'une paire électron-trou, puis d'espèces activées de l'oxygène (radicaux hydroxyles, oxygène singulet, radical superoxyde) après réactions avec l'eau ou l'oxygène. Le revêtement des particules de TiO_2 avec des oxydes inertes comme ceux de silicium, d'aluminium ou de zirconium réduit ou élimine cet inconvénient.

Cependant, l'un des problèmes posés par les études examinées est l'ignorance souvent totale de la nature et de l'importance des traitements de surface appliqués à ces particules

(Anonyme, 2004), alors qu'ils ont très probablement des répercussions sur les propriétés toxicologiques (voir chapitre 1, point 4 ; chapitre 7, point 1 ; Warheit et coll., 2005).

2.1. TiO_2 non ultra-fin (rappels résumés)

Le dioxyde de titane est fabriqué à partir de minerais naturels, soit par un procédé utilisant l'acide sulfurique (minerais relativement pauvres, comme l'ilménite, et hors rutile), soit en passant par la formation du tétrachlorure (minerais riches, rutile), ensuite purifié puis traité par l'oxygène aux environs de 1 400 °C. La production mondiale, relativement constante depuis l'an 2000, est de l'ordre de 4 millions de tonnes par an. Pour l'utilisation la plus courante (environ 70 %), c'est-à-dire comme pigment, les particules de TiO_2 ont des tailles voisines de 250 à 300 nm (170-180 nm pour les plastiques et papiers, 350-400 nm pour des peintures mates), qui le font en général qualifier de « fin » et non pas d'ultra-fin.

2.1.1. Propriétés physicochimiques

TiO_2 est un solide blanc réfringent, thermostable (point de fusion supérieur à 1 800 °C), cristallin sous deux formes allotropiques principales, l'anatase (densité 3,90) et le rutile (densité 4,23). Il est insoluble dans l'eau, les acides, l'alcool, mais soluble dans l'acide sulfurique concentré, l'acide fluorhydrique ou les bases concentrées.

Le TiO_2 sert comme pigment de peintures ou charge pour les papiers, additif pour les polymères ou encore catalyseur. On le trouve aussi dans les baguettes de soudage, les céramiques, des produits pharmaceutiques, les cosmétiques, les aliments... C'est encore le principal composant de grenades fumigènes utilisées par l'armée ; cette dernière a fait un point relatif à la toxicologie du TiO_2 , document partiellement utilisé ici (National Research Council, 1999). La majeure partie des produits utilisant TiO_2 recourt à du rutile de taille de particules 200 à 300 nm.

2.1.2. Toxicologie chez l'homme

Garabrant et coll. (1987) ont effectué une étude transversale de troubles de la fonction pulmonaire et d'anomalies radiologiques parmi 209 travailleurs employés à la production de TiO_2 . Des plaques pleurales ont été trouvées chez 17 %, en lien tant avec une exposition passée à l'amiante qu'avec la durée d'emploi à la production ; le lien subsistait après correction pour l'exposition passée à l'amiante. Selon les auteurs, les résultats sont compatibles avec l'hypothèse d'une réduction de la capacité pulmonaire suite à l'exposition à TiCl_4 ou à des particules de TiO_2 , voire avec l'apparition de plaques pleurales.

Chen et Fayerweather (1988) ont étudié les risques de cancer pulmonaire, maladie respiratoire chronique, fibrose pulmonaire ou plaques pleurales chez 1 576 travailleurs de la société DuPont exposés au TiO_2 de 1956 à 1985 (cancer pulmonaire et maladies respiratoires chroniques) ou de 1935 à 1983 (mortalité). D'éventuelles anomalies radiologiques ont été recherchées dans une sous-cohorte de 398 travailleurs. Aucune association significative n'a été observée entre exposition au TiO_2 et maladie respiratoire, maligne ou non maligne, aucune anomalie radiologique et aucune fibrose n'ont été détectées. L'exposition moyenne par inhalation se situait dans l'étendue 1 à 20 mg/m^3 (médiane 10 mg/m^3). Le NIOSH (2005) a considéré que la médiocre qualité technique de cette étude ne permettait pas d'en tirer des conclusions.

Dans une étude menée sur le risque de cancer pulmonaire dans une partie de la population de Montréal, 857 cas de cancer pulmonaire diagnostiqués pendant la période 1979-1985 parmi les hommes âgés de 35 à 70 ans ont été sélectionnés ; le groupe de référence était constitué de 533 hommes en bonne santé tirés au hasard et de 533 hommes avec un cancer non pulmonaire (Boffetta et coll., 2001). L'exposition des personnes au TiO_2 a été évaluée par une équipe d'hygiénistes du travail à partir des réponses à un questionnaire relatif notamment aux métiers pratiqués. Trente-trois cas de cancer et 43 témoins ont été classés comme exposés au TiO_2 . L'odds ratio était de 0,9 (IC95 : 0,5-1,5). Il n'y avait aucun lien apparent avec la fréquence, le niveau ou la durée des expositions. L'odds ratio était égal à l'unité (IC95 : 0,3-2,7) pour les personnes exposées au moins cinq ans à des concentrations supposées moyennes ou élevées. Selon les auteurs, cette étude ne donne aucune indication que l'exposition au TiO_2 pourrait accroître le risque de cancer pulmonaire, mais de mauvaises classifications de niveaux d'exposition ou une faible prévalence de l'exposition ont pu être à l'origine de faux négatifs.

Fryzek et coll. (2003) ont réalisé une étude de mortalité rétrospective sur une cohorte de 4 241 travailleurs dans quatre usines des États-Unis employés pendant au moins six mois à partir de janvier 1960, jusqu'au 31 décembre 2000. L'exposition a été évaluée à partir des carrières professionnelles par des hygiénistes du travail expérimentés. Les concentrations médianes d'exposition ont baissé de 4,6 mg/m^3 entre 1976 et 1980 à 1,1 mg/m^3 entre 1996 et 2000. Les travailleurs employés à l'emballage, au broyage ou au recyclage interne étaient les plus exposés (3,0 mg/m^3 à comparer à 0,3-0,9 mg/m^3 pour les autres postes). Des données tabagiques ont pu être retrouvées pour 2 501 travailleurs. Le SMR a été calculé par rapport à la population générale. Globalement, la mortalité était inférieure à celle attendue (SMR : 0,85 ; IC95 : 0,80-0,90), et était encore plus faible chez les travailleurs estimés les plus exposés (SMR : 0,7 ; IC95 : 0,6-0,9). Les auteurs concluent à l'absence de risque cancérogène par exposition professionnelle à TiO_2 , mais leurs résultats ont été attribués par Beaumont et coll. (2004) à un choix critiquable des méthodes d'analyse statistique.

Une autre étude a été menée sur 15 017 travailleurs (14 331 hommes) exposés au TiO_2 entre 1927 et 2001 dans onze usines de production de six pays d'Europe (Boffetta et coll., 2004). Les périodes de suivi s'étalaient de 27 années (Italie) à 47 années (Royaume-Uni). L'exposition a été évaluée par des hygiénistes du travail expérimentés à partir de la carrière professionnelle et de mesurages effectués dans les années 1990 ; l'exposition cumulée moyenne a été évaluée à 1,98 $\text{mg}/\text{m}^3/\text{an}$ (écart interquartile 0,26-6,88 $\text{mg}/\text{m}^3/\text{an}$). La mortalité a été comparée aux taux nationaux correspondants. Le SMR obtenu à partir de 2 652 décès s'élevait à 0,87 (IC95 : 0,83-0,90) pour les hommes (2 619 décès) et 0,58 (IC95 : 0,40-0,82 ; 33 décès) pour les femmes. Seul le risque de cancer pulmonaire était significativement élevé chez les hommes (SMR : 1,23 ; IC95 : 1,10-1,38), mais n'augmentait pas avec la durée de l'emploi ni avec l'estimation de l'exposition cumulée. La mortalité approchait celle attendue si l'on recourait aux données locales de mortalité. Des données relatives au tabagisme étaient accessibles pour 37,6 % de la cohorte ; dans trois des pays, la prévalence du tabagisme était supérieure à celle de la population nationale. D'après les auteurs, ces résultats ne semblent pas indiquer d'effet cancérigène sur le poumon du TiO_2 .

Ces données sont résumées dans le tableau 5.I.

D'après Hext et coll. (2005), bien que les études américaines aient nettement moins de puissance que les européennes (cohorte inférieure au tiers), le nombre de travailleurs qu'elles incluent (presque 6 000) permettrait de détecter une petite augmentation du risque cancérigène. Ils n'ont trouvé aucune raison convaincante aux différences de résultats avec l'étude européenne, et soulignent que ces trois publications (Chen et Fayerweather, 1988 ; Fryzek et coll., 2003 ; Boffetta et coll., 2004) totalisent 20 862 travailleurs dans dix-sept usines, et 328 décès par cancer pulmonaire. Cette globalisation des résultats paraît discutable dans la mesure où les protocoles sont différents, les évaluations d'exposition reposent sur des approches différentes (par exemple métrologies à point fixe ou individuelles ; voir Hext et coll., 2006) ou d'une fiabilité médiocre (évaluations rétrospectives à partir de carrières professionnelles et d'évolutions industrielles plus ou moins bien cernées), et les populations partiellement identiques pour les deux études américaines.

Pour Hext et coll. (2005), la meilleure explication au fait que seule l'étude européenne trouve un accroissement du risque de cancer pulmonaire tiendrait à des variations régionales de la mortalité pour cette affection. Ils concluent que les données épidémiologiques associées à ce qu'on sait du mécanisme chez l'animal (leur point de vue est résumé dans le paragraphe « cancérogenèse chez le rat », 2.2.3, ci-après) sont nettement en faveur d'un risque très faible pour la santé humaine résultant de l'exposition au TiO_2 , y compris ultra-fin ; pour ce dernier toutefois, cette opinion ne s'appuie que sur des données animales (Bermudez et coll., 2002, 2004 ; Hext et coll., 2002).

Population considérée	Résumé des observations	Références
209 travailleurs employés à la production de TiO_2 .	Plaques pleurales chez 17 % (en lien avec l'exposition passée à l'amiante et la durée d'emploi), et réduction de la capacité pulmonaire.	Garabrant et coll. (1987)
Homme, exposition professionnelle (1 576 travailleurs, 1956-1985).	Pas d'augmentation des cancers pulmonaires ni des maladies respiratoires. Pas de fibrose pulmonaire. NOAEL estimé à 20 mg/m^3 .	Chen et Fayerweather (1988)
Étude de risque de cancer pulmonaire dans la population (857 cas, 1 066 témoins). Exposition appréciée à partir de questionnaires.	Aucune augmentation apparente du risque, même chez les personnes supposées les plus exposées (en durée ou en concentration).	Boffetta et coll. (2001)
Étude de mortalité rétrospective (4 241 travailleurs dans 4 usines). Expositions évaluées de $4,6 \text{ mg/m}^3$ (1976-1980) à $1,1 \text{ mg/m}^3$ (1996-2000 ; $3,0 \text{ mg/m}^3$ pour les plus exposés). Données tabagiques pour 2 501 travailleurs.	Globalement, mortalité inférieure à celle attendue (SMR : 0,85 ; IC95 : 0,80-0,90), et plus faible chez les travailleurs estimés les plus exposés (SMR : 0,7).	Fryzek et coll. (2003)
Étude sur 15 017 travailleurs (14 331 hommes, 11 usines, 6 pays). Suivi de 27 (Italie) à 47 années (Royaume-Uni). Exposition cumulée moyenne $1,98 \text{ mg/m}^3/\text{an}$ (écart inter-quartile 0,26-6,88 $\text{mg/m}^3/\text{an}$). Mortalité comparée aux taux nationaux.	Hommes : SMR (2 619 décès) : 0,87 (IC95 : 0,83-0,90). Cancer pulmonaire : SMR : 1,23 (IC95 : 1,10-1,38), n'augmente pas avec la durée d'emploi ni l'exposition cumulée. Données tabagiques pour 37,6 % de la cohorte. Conclusion : « pas d'effet cancérigène apparent sur le poumon. »	Boffetta et coll. (2004)

Tableau 5.I. Résumé des effets pour la santé humaine de l'exposition professionnelle au TiO_2 non ultra-fin.

2.2. TiO_2 ultra-fin (seul ou en comparaison)

Le dioxyde de titane ultra-fin se présente généralement sous la forme de particules de 20 à 30 nm de diamètre. Sauf traitement de surface spécifique ou forte dispersion, ces particules forment naturellement des agglomérats de tailles similaires à ceux formés par des particules fines (de l'ordre de 0,7 à $1,5 \mu\text{m}$; voir Bermudez et coll., 2004 ; Oberdörster

et coll., 1994a ; Ferin et coll., 1992). Le TiO_2 ultra-fin présente des propriétés catalytiques intéressantes, mises à profit dans diverses applications (Frazer, 2001).

2.2.1. Chez l'animal, par inhalation ou instillation intratrachéale

Creutzenberg et coll. (1990) ont analysé la clairance de particules tests (oxyde de fer, diamètre 0,35 μm , ou particules de latex, diamètre 3,5 μm) chez des rats exposés en chronique à un aérosol de TiO_2 qualifié d'ultra-fin (MMAD 0,8 μm ; 10 mg/m^3 , 19 h/j, 5 j/sem, 18 mois, suivis d'une période de récupération de 6 mois). Des animaux ont été sacrifiés pour examen après 3, 6, 12, 18, 22 ou 24 mois. La charge pulmonaire s'élevait à environ 40 mg après l'exposition à 1 mg/m^3 dans ces conditions (bien noter l'exposition à 19 heures par jour). Cette clairance était systématiquement ralentie : chez les rats témoins (non exposés), elle passait de 61 à 93 jours (oxyde de fer), à comparer à 208 à 368 jours chez les rats exposés. La clairance était plus fortement variable pour les particules de latex, des temps de rétention supérieurs étant observés après trois et six mois d'exposition, et inférieurs par la suite, ce qui pourrait être dû à un dépôt pulmonaire plus proximal de ces particules plus grosses, résultant de modifications de l'architecture bronchique après exposition prolongée et/ou des paramètres de la respiration.

Dans une série d'expérimentations rapportées sous divers angles (Ferin et coll., 1992 ; Oberdörster et coll., 1994a, 1994b), des groupes de rats mâles Fisher 344 ont été exposés à du TiO_2 , soit par inhalation (6 h/j, 5 j/semaine, 12 semaines) à des poussières fines (250 nm ; 23,0 mg/m^3) ou ultra-fines (21 nm ; 23,5 mg/m^3), soit par instillation intratrachéale (12, 21, 230 ou 250 nm – 500 μg). Les diamètres aérodynamiques médian en masse et leur écart-type étaient similaires pour les deux aérosols en raison de la formation d'agrégats. Des lavages pulmonaires ont été réalisés à différents temps après l'arrêt de l'exposition, et des analyses des particules pratiquées dans les poumons, le liquide de lavage et les ganglions lymphatiques, par microscopies optique et électronique. À masse équivalente, les particules ultra-fines pénétraient l'interstitium pulmonaire de façon plus marquée que les fines. Le nombre de macrophages alvéolaires était également supérieur. L'augmentation de la dose en nombre de particules, la diminution de la taille, ou la vitesse d'administration des particules favorisaient la pénétration. Celle-ci se traduisait par un temps de demi-vie pulmonaire augmenté ($T_{1/2} = 501$ jours pour les ultra-fines, 174 jours pour les fines). Ces résultats confirmaient ceux de Driscoll et Maurer (1991) dans leur comparaison entre TiO_2 et SiO_2 (cristalline). La comparaison des données entre particules fines et ultra-fines montre que les réponses (translocation, PMN) sont corrélées avec la surface totale des particules du TiO_2 et non pas leur masse (Oberdörster et coll., 1994a, 1994b).

Janssen et coll. (1994) ont étudié chez le rat l'expression de l'ARN messager (ARNm) codant pour la superoxyde dismutase dépendant du manganèse (MnSOD ; la MnSOD est l'une des enzymes dites « antioxydantes » impliquées dans la défense pulmonaire contre

un excès d'espèces activées de l'oxygène après inhalation subchronique d'aérosols de minéraux de différentes capacités inflammatoires et fibrosantes, la cristobalite, la silice et le TiO_2 , fin ou ultra-fin. La cristobalite et le TiO_2 ultra-fin ont provoqué une forte augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour la MnSOD ; les augmentations étaient plus limitées pour les autres enzymes antioxydantes (catalase, glutathion peroxydase, CuZnSOD). Ces réactions n'ont pas été observées pour le TiO_2 fin. Les modifications du LLBA liées aux réactions inflammatoires (recrutement cellulaire total et différentiel) étaient corrélées aux niveaux de l'ARNm pour la MnSOD ; cette dernière pourrait donc, selon les auteurs, constituer un indicateur prédictif de l'atteinte pulmonaire.

Heinrich et coll. (1995) ont exposé des rats et des souris à des PUF de TiO_2 (Degussa P₂₅) à la concentration moyenne de 10 mg/m^3 (les concentrations ont varié dans le temps en fonction de l'état des animaux et des charges pulmonaires mesurées), 18 h/j, 5 j/sem, pendant une durée pouvant atteindre 24 mois. Le diamètre médian en masse des particules (agglomérats) était de $0,8 \mu\text{m}$ (écart-type $1,8 \mu\text{m}$) et leur surface spécifique $48 \text{ m}^2/\text{g}$. Les rats ont généralement été exposés pendant 18 mois (suivis de 6 mois sans exposition), et les souris pendant 13,5 mois (suivis de 9,5 mois sans exposition). À la fin de l'expérimentation, les rats exposés avaient en moyenne $39,3 \text{ mg}$ de TiO_2 dans les poumons (dont le poids était significativement augmenté), pesaient moins et survivaient moins longtemps que les rats témoins. Les indicateurs d'atteinte pulmonaire et de réaction inflammatoire étaient accrus dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire. Après 6 mois d'exposition, l'examen histopathologique révélait la présence de macrophages chargés de particules, une hyperplasie bronchique, et une fibrose légère. Après 24 mois, fibrose légère à modérée et hyperplasie bronchoalvéolaire sont mentionnées. Des observations similaires sont rapportées pour des rats exposés en parallèle à des PUF de carbone (11 mg/m^3) ou des particules diesels (7 mg/m^3). Les souris avaient une charge pulmonaire en TiO_2 de $5,2 \text{ mg}$ après 12 mois d'exposition, et poids pulmonaire et mortalité étaient accrus (aucune donnée histopathologique n'est présentée). Une incidence accrue de tumeurs pulmonaires était observée chez les rats femelles (32 % à comparer à 0,5 % chez les témoins), mais pas chez les souris. Heinrich et coll. n'observent pas de relation linéaire entre le taux de tumeurs pulmonaires et la surface totale des particules retenues, mais ce taux s'élève plutôt avec la concentration massique cumulée ($\text{mg/m}^3/\text{h}$), indépendamment du type de particule. Les auteurs sont d'avis que ces données établissent la responsabilité principale de la particule solide dans la genèse des cancers pulmonaires, les substances organiques adsorbées n'intervenant apparemment que marginalement.

Note. Le TiO_2 P₂₅ fabriqué par la société allemande Degussa a souvent servi dans les expérimentations. Il faut toutefois signaler qu'il est de composition complexe, c'est-à-dire un mélange d'anatase et de rutilé (dans les proportions d'environ 80/20) et de particules amorphes. Des particules d'anatase peuvent être recouvertes d'une fine couche de rutilé. L'activité photocatalytique de ce mélange semble supérieure à celle des phases pures (Bickley et coll., 1991 ; Hurum et coll., 2003).

Baggs et coll. (1997) ont exposé par inhalation des rats Fisher mâles à des aérosols de TiO_2 fin (250 nm, 22,3 mg/m³) ou ultra-fin (20 nm, 23,5 mg/m³) 6 heures par jour, 5 jours par semaine, pendant 3 mois, et suivi les effets pulmonaires (fibrose ; colorations à l'hématoxyline et l'éosine). Le TiO_2 UF était légèrement moins fibrosant que la silice cristalline prise comme référence (0,8 µm, 1,3 mg/m³) ; le TiO_2 fin était le moins actif. Les fibroses étaient réversibles et les animaux revenus à des paramètres normaux après une année sans exposition, mais des amas de macrophages chargés de particules étaient toujours présents.

Borm et coll. (2000) ont instillé par voie intratrachéale des rats Wistar femelles avec différents types de particules, dont TiO_2 fin (0,25 µm ; 6 fois 10 mg) ou ultra-fin (21 nm ; 3 fois 10 mg), et observé l'atteinte pulmonaire (inflammation, tumeurs) en fin de vie des animaux (sacrifices semaine 129). Globalement, l'incidence des tumeurs pulmonaires était liée à l'inflammation exprimée en nombre de granulocytes ou de macrophages par mm³ de poumon examiné ; la seule exception notable (qualifiée de « point aberrant ») était TiO_2 ultra-fin, pour lequel l'incidence des tumeurs était de 66 % (dose totale 30 mg) à comparer à 27 % (fines, dose totale 60 mg), alors qu'il provoquait des réactions d'inflammation faibles (au moment du sacrifice, avec détermination par coloration). Les auteurs suggèrent que l'incidence des tumeurs est en lien direct avec la rétention interstitielle des particules plutôt qu'avec la surcharge pulmonaire en elle-même (présente dans les deux cas). À noter que cette hypothèse, évoquée dès 1986 par Takenaka et coll., diverge de celle de Hext et coll. (2005 ; voir ci-après 2.2.3, « Cancérogenèse chez le rat ») pour qui l'interstitialisation pourrait être un facteur de relative protection contre le cancer pulmonaire chez l'homme, par rapport au rat pour qui elle est relativement faible.

Oberdörster et coll. (2000) ont également étudié les effets de l'instillation pulmonaire de TiO_2 fin (250 nm) ou ultra-fin (20 nm) chez le rat ou la souris mâles (tableau 5.II), et constaté que les réactions inflammatoires étaient corrélées à la surface spécifique (% PMN dans le LLBA 24 h après instillation).

	TiO₂ fin (6 m²/g)	TiO₂ UF (48 m²/g)	Suspension saline
Rats mâles	125, 500, ou 2 000 µg	31, 125 ou 500 µg	0,25 ml
Souris mâles	25, 100 ou 400 µg	6, 25 ou 100 µg	0,05 ml
Sacrifice de 3 animaux 6, 24 et 48 h après instillation.			
Étude du LLBA (recrutement cellulaire total et différentiel, viabilité cellulaire, protéines totales, LDH, β-glucuronidase)			

Tableau 5.II. Aperçu schématique des conditions d'expérimentation relatives à TiO_2 rapportées par Oberdörster et coll. (2000).

Le TiO_2 ultra-fin amplifiait nettement la réponse inflammatoire induite par une endotoxine ou l'instillation de PUF seules, mais rien de tel n'était observé avec le TiO_2 fin. L'âge des animaux et la coexposition à l'ozone étaient des facteurs aggravant l'inflammation pulmonaire (essais avec des PUF de carbone).

Hext et coll. (2002) ont exposé par inhalation des rats, souris, ou hamsters mâles à des aérosols de TiO_2 fin (10, 50 ou 250 mg/m^3) ou ultra-fin (0,5, 2 ou 10 mg/m^3), 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 13 semaines, et évalué les charges pulmonaires et les réactions inflammatoires après des périodes de repos de 1, 3, 6 ou 12 mois. Ils considèrent que la surcharge pulmonaire était avérée après exposition à 50 ou 250 mg/m^3 (TiO_2 fin) ou à 10 mg/m^3 (TiO_2 ultra-fin), d'après les évaluations de la charge pulmonaire en TiO_2 , de l'inflammation pulmonaire, et du ralentissement de la clairance. Les lésions pulmonaires chez le rat continuaient à se développer après exposition à 250 mg/m^3 ; dans les autres cas, elles régressaient. Malgré une charge pulmonaire similaire, les souris présentaient des réactions inflammatoires moindres, et qui régressaient dans le temps. La clairance pulmonaire était la plus rapide chez les hamsters (charge pulmonaire d'environ 20 % de celle du rat après exposition à 10 mg/m^3 de TiO_2 ultra-fin). Cette étude et d'autres plus ou moins proches montrent des différences de réponse pulmonaire entre espèces différentes et contribuent à alimenter le questionnement de la pertinence de la transposition du rat vers l'homme, notamment pour le risque de cancérogenèse pulmonaire consécutif à des expositions prolongées à de fortes concentrations d'aérosols de particules peu solubles et réputées faiblement toxiques.

Höhr et coll. (2002) ont choisi l'instillation pour étudier chez le rat les rôles respectifs de la surface et du revêtement de surface (hydrophile ou hydrophobe) dans l'inflammation pulmonaire avec des échantillons de TiO_2 fin (180 nm) ou ultra-fin (20-30 nm). La réponse (LLBA : recrutement cellulaire et % de PMN, LDH, phosphatase alcaline, β -glucuronidase, *N*-acétyl- β -glucosaminidase, myéloperoxydase) a été étudiée à 16 heures, soit à masse équivalente (1 ou 6 mg), soit à surface équivalente (100, 500 ou 600, et 3 000 cm^2). La surface hydrophobe provoquait une réponse moindre à faible dose, mais les résultats n'étaient pas significativement différents du point de vue statistique. Aucune différence n'était observée aux doses élevées (6 mg ou surface > 600 cm^2). Les auteurs concluent que c'est la surface totale plutôt que la nature du revêtement qui détermine la réponse pulmonaire inflammatoire après instillation.

C'est à la formation de radicaux libres que se sont intéressés Dick et coll. (2003), après instillation pulmonaire chez le rat Wistar de différents échantillons de PUF de noir de carbone, oxyde de cobalt, nickel ou TiO_2 (20 nm, $36 \text{ m}^2/\text{g}$), dans le but de déterminer quels attributs (surface, composition, nombre de particules, ou réactivité de surface) contribuent le plus fortement à la toxicité et aux effets inflammatoires. Le TiO_2 n'induisait pas de réponse significative (PMN) ; les niveaux de MIP-2 observés après 4 heures et l'afflux de neutrophiles relevé après 18 heures étaient compatibles avec l'hypothèse de formation de radicaux libres à la surface des particules.

Bermudez et coll. (2004) ont exposé des rats femelles, des souris et des hamsters à des aérosols de TiO_2 ultra-fin (échantillon de Degussa P_{25} ; la taille moyenne des particules primaires est 21 nm, selon Bermudez et coll. ; d'après Tomson [2003] : anatase 80 %, rutile 20 %, surface spécifique : $46,9 \text{ m}^2/\text{g}$; taille moyenne des particules 33 nm), aux concentrations de 0,5, 2,0 ou $10 \text{ mg}/\text{m}^3$, 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 13 semaines suivies de périodes de récupération de 4, 13, 26 ou 52 semaines (49 semaines pour les hamsters). Le diamètre aérodynamique des particules a été mesuré à 1,29-1,44 μm .

Ces auteurs ont évalué un ensemble de paramètres pulmonaires (inflammation, cytotoxicité, prolifération cellulaire, altérations histopathologiques) ainsi que les charges pulmonaires et des ganglions lymphatiques. Les charges pulmonaires étaient liées aux niveaux et durées d'exposition ; elles étaient maximales en fin de période d'exposition, et similaires pour les rats et souris (en mg par g de poumon sec), mais nettement plus faibles pour les hamsters. Toutes décroissaient en période de non-exposition et atteignaient respectivement 57, 45 et 3 % de la charge maximale pour les rats, souris et hamsters, à la fin de la période de repos. L'inflammation pulmonaire chez les rats et les souris était objectivée par une infiltration de macrophages et de neutrophiles, ainsi que des augmentations de concentrations de différents marqueurs solubles dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LLBA). Les variations des populations des neutrophiles et des macrophages différaient entre rats et souris. Chez les hamsters, on n'observait aucune modification significative au niveau cellulaire ou des différents paramètres suivis du LLBA, reflet de leurs grandes capacités d'épuration pulmonaire.

Des modifications épithéliales fibroprolifératives apparaissaient progressivement chez les rats exposés à la plus forte concentration (prolifération focale de cellules métaplasiques autour d'accumulations de macrophages fortement chargés de particules), ainsi qu'une accumulation de particules interstitielles et une fibrose alvéolaire, s'aggravant avec la prolongation de l'exposition. Ces modifications n'apparaissaient ni chez les souris ni chez les hamsters.

Les demi-vies ont été comparées entre TiO_2 (à usage de pigment) et TiO_2 (ultra-fin) chez les différentes espèces (tableau 5.III).

Bien que la toxicité supérieure des PUF par rapport aux particules micrométriques, à masse égale, ait été souvent démontrée auparavant, Renwick et coll. (2004) l'ont revérifié à partir de particules de noir de carbone (260 nm et $7,9 \text{ m}^2/\text{g}$, ou 14 nm et $254 \text{ m}^2/\text{g}$) et de TiO_2 (250 nm et $6,6 \text{ m}^2/\text{g}$, ou 29 nm et $49,8 \text{ m}^2/\text{g}$). Ces auteurs ont recouru à l'instillation pulmonaire chez le rat suivi de l'analyse du LLBA. Leurs résultats confirment, à masse égale, que des effets plus marqués (recrutement de PMN, dommage épithélial, cytotoxicité) sont obtenus, à masse égale, avec des PUF qu'avec leurs homologues fines. Ils soulignent que les effets du noir de carbone sont supérieurs à ceux du TiO_2 , ce qui semble montrer que des PUF de nature différente peuvent

	Concentration (mg/m ³)	Demi-vies (jours)		
		Rat	Souris	Hamster
TiO ₂ (pigment)	250	838	621	110
	50	324	417	40
	10	100	50	40
TiO ₂ (UF)	10	395	319	39
	2	132	40	37
	0,5	63	48	33

Tableau 5.III. Demi-vies pulmonaires de particules de TiO₂ (pigment ou ultra-fin) chez 3 espèces animales après inhalation à différentes concentrations. D'après Hext et coll. (2005).

présenter des toxicités différentes (autrement dit : la toxicité n'est pas qu'une question de taille de particule).

Hext et coll. (2005), revenant sur les résultats de Bermudez et coll. (2002, 2004), observent que les comparaisons entre charge pulmonaire et réponses biologiques ne suivent pas la logique. Par exemple, chez le rat exposé à 10 mg/m³, la charge pulmonaire et les modifications pathologiques sont supérieures avec le TiO₂ ultra-fin par rapport au TiO₂ fin, ce qui a naguère fait dire que les PUF sont plus toxiques que les fines. Cependant, lorsque les charges pulmonaires sont exprimées en surface totale de particules par unité de masse pulmonaire (m²/g), les corrélations deviennent nettement meilleures (sont cités : Oberdörster, 1996 ; Lison et coll., 1997 ; Tran et coll., 2000), ce qui est aussi observé ici pour les comparaisons des effets, des charges pulmonaires, des demi-vies, et des réponses biologiques. Ceci, concluent les auteurs, est totalement logique puisque les réactions biologiques avec une particule insoluble ne peuvent se produire qu'à sa surface.

Logiquement, Warheit et coll. (2005) ont cherché d'éventuelles différences de toxicité chez le rat Sprague-Dawley mâle, après inhalation (4 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine) ou instillation (2 ou 10 mg/kg), d'échantillons de PUF de TiO₂ (rutil) ayant reçu des traitements de surface différents (tableau 5.IV).

Selon les auteurs, les effets pulmonaires (clairance et hyperplasie des cellules épithéliales de type II) de ces différents échantillons, qualitativement similaires, diffèrent pourtant légèrement en intensité. Par ailleurs, une légère formation de collagène a été observée pour l'échantillon III, pour lequel la teneur totale en alumine et silice amorphe, comme la surface spécifique, sont les plus élevées.

Dans une très brève communication, Warheit (2005) compare les toxicités pulmonaires relatives chez le rat après instillation intratrachéale (1 ou 5 mg/kg) de différentes

Échantillon de TiO ₂	Formulation	Taille de la particule primaire (nm)	Surface spécifique BET (m ² /g)	Concentration aérosol (mg/m ³)	MMAD (μm)
« de base »	99 % TiO ₂ , 1 % Al ₂ O ₃ « co-oxydé »	300	6	1 130	1,3
I	Idem + triéthanolamine	300	6	1 240	1,5
II	96 % TiO ₂ , 4 % Al ₂ O ₃	320	9,4	1 310	1,7
III	82 % TiO ₂ , 7 % Al ₂ O ₃ , 11 % silice amorphe	440	27,8	1 300	1,8
IV	92 % TiO ₂ , 2 % Al ₂ O ₃ , 6 % silice amorphe	370	10,5	1 130	1,8
V	94 % TiO ₂ , 3 % Al ₂ O ₃ , 3 % silice amorphe	290	12,2	1 140	1,8

Tableau 5.IV. Échantillons et leurs traitements de surface examinés par Warheit et coll. (2005). MMAD : *Mass Median Aerosol Diameter* (diamètre médian en masse de l'aérosol).

formes de TiO₂ : microfibres (30×250 nm), particules fines (300 nm) ou PUF (10 nm), après 1 jour, 1 semaine, et 1 ou 3 mois. Les résultats préliminaires ne montrent aucune différence significative pour l'inflammation ou la cytotoxicité, ce qui va dans le sens que la taille de la particule n'aurait pas une influence déterminante sur sa toxicité, contrairement à ce qui avait été trouvé auparavant (Bermudez et coll., 2004 ; Heinrich et coll., 1995 ; Lee et coll., 1985a, 1985b). Ainsi, avancent Tsuji et coll. (2006), le TiO₂ P₂₅ couramment utilisé pourrait n'être pas représentatif de l'ensemble des nanoparticules de TiO₂, dont la toxicité pulmonaire devrait être étudiée au cas par cas. En effet, en sus de la taille et de la surface totale, il faut tenir compte, entre autres choses, du nombre et de la distribution granulométrique, de la dose parvenue à l'organe cible, des revêtements de surface, du degré d'agglomération, des charges superficielles, de la forme, du potentiel d'attraction électrostatique, et du procédé de fabrication.

Commentant par la suite leurs résultats (Warheit et coll., 2006), ces chercheurs reconnaissent qu'ils vont à contre-courant de l'idée d'une toxicité des nanoparticules de TiO₂ en lien avec leur surface. Les surfaces spécifiques des échantillons étudiés étaient en effet de 6 m²/g (TiO₂ fin), 26 m²/g (microfibres) et 169 m²/g (nanoparticules) ; les auteurs s'interrogent donc sur l'influence possible de la forme cristalline (l'anatase formant *in vitro* nettement plus d'EAO que le rutile). Ils soulignent par ailleurs que l'agrégation ne réduit pas dramatiquement l'importance de la surface spécifique (les nanoparticules de TiO₂ ont une surface encore supérieure à

100 m²/g), mais n'excluent pas l'intervention de la désagrégation *in vivo*. En définitive, ils reconnaissent que la raison pour laquelle leurs résultats ne sont pas dans la ligne des précédents leur échappe, et concluent qu'il faut plus de résultats d'études systématiques de l'influence de la taille et de la surface avant de tirer des conclusions générales relatives à la taille.

Il est à remarquer que, dans un travail sur cultures cellulaires (fibroblastes de peau humaine et cellules épithéliales pulmonaires humaines) en conditions ambiantes (notamment hors illumination), Sayes et coll. (2006) trouvent que la cytotoxicité de PUF (tailles 3-10 nm, surfaces spécifiques 110-155 m²/g) d'anatase est de l'ordre de 100 fois supérieure à celle de PUF de rutil, ceci semblant lié à la capacité de production d'EAO. Les auteurs notent que « dans cette étude, la modification du comportement cellulaire n'était pas liée à la surface des PUF de TiO₂. »

Dans un autre travail *in vitro*, sur microglies de souris immortalisées (BV2), le TiO₂ P₂₅ (particules de taille de l'ordre de 30 nm) a provoqué, à doses non cytotoxiques (2,5 à 120 ppm), une émission d'EAO quasi immédiate (en moins de 5 minutes) et surtout durable (plus de 2 heures). L'examen par microscopie électronique à transmission a montré que des petits groupes de nanoparticules isolées et des agrégats de taille micro-nique étaient internalisés dans le cytoplasme (Long et coll., 2006). La portée de ce travail ne peut être évaluée, car on ignore si des nanoparticules de TiO₂ peuvent parvenir *in vivo* aux cellules cérébrales et, si c'était le cas, leur concentration serait probablement très faible en regard de celles testées par ces chercheurs.

Le tableau 5.V (page suivante) résume ces données.

2.2.2. Mutagenèse – Génotoxicité

Rahman et coll. (2002) ont montré que TiO₂ ultra-fin (≤ 20 nm ; 0,5 à 10 µg/cm²) induisait une apoptose et une formation de micronoyaux dans des cellules embryonnaires de hamster syrien. Les auteurs soulignent que ces types d'effet sont généralement observés pour des substances potentiellement cancérigènes, mais qu'ils sont trop en amont de la tumorigenèse pour en conclure que TiO₂ est doué d'un potentiel cancérigène. De plus, le mécanisme est encore non élucidé.

Cunningham et coll. (2005) ont exposé *in vitro* des kératinocytes humains de nouveau-nés à des PUF de silice (Min-U-Sil 5), TiO₂ ou noir de carbone (Printex 90) et examiné par analyse (sur puce à ADN, technique dite du microarray) les gènes humains exprimés, sur un ensemble de 9 970. Des gènes similaires étaient exprimés pour les 3 échantillons (par exemple pour des protéines structurales, comme les laminines), mais il y avait des différences pour des gènes exprimant des protéines et cytokines des ribosomes. Ce travail n'est présenté que dans un résumé de quelques lignes.

Espèce et conditions d'exposition	Observations et conclusions	Références
Rats Wistar femelles, particules « ultrafines » (0,8 µm MMAD), expositions à 10 mg/m ³ , 19 h/j, 5 j/sem, 24 mois.	Clairance alvéolaire d'un traceur retardée. Masse des poumons augmentée.	Creutzenberg et coll. (1990)
Rats mâles F344, particules fines (250 nm) ou ultra-fines (21 nm), expositions (env. 23 mg/m ³) 6 h/j, 5 j/sem, jusqu'à 12 sem, ou instillation intratrachéale (65 ou 1 000 µg ; 12 à 250 nm).	Translocation, rétention, inflammation (PMN) et toxicité (prolifération cellules de type II, fibrose interstitielle légère) pulmonaires accrues pour les PUF.	Ferin et coll. (1992), Oberdörster et coll. (1994a, b)
Rats, inhalation subchronique de différents aérosols solides (SiO ₂ , TiO ₂ UF).	Forte augmentation du facteur de transcription pour MnSOD pour TiO ₂ UF, pas pour TiO ₂ fin.	Janssen et coll. (1994)
Rats Wistar femelles ou souris femelles (NMRI ou C57BL/6N), particules « ultrafines » (0,8 µm MMAD), concentration 7,2 (4 mois), 14,8 (4 mois), puis 9,4 mg/m ³ (16 mois ; moyenne 10 mg/m ³), 18 h/j, 5 j/sem, 24 (rats) ou 13,5 mois (souris).	Charge pulmonaire 39,3 (rats, 24 mois) ou 5,2 mg/poumon (souris, 12 mois). Clairance ralentie. Hyperplasie épithéliale, fibrose, tumeurs (rats seuls)	Heinrich et coll. (1995)
Rats Fisher 344 mâles, TiO ₂ fin (250 nm, 22,3 mg/m ³) ou UF (20 nm, 23,5 mg/m ³), ou SiO ₂ (cristalline, 0,8 µm, 1,3 mg/m ³), 6 h/j, 5 j/sem, 3 mois.	Fibrose : SiO ₂ ≥ TiO ₂ UF > TiO ₂ fin, avec retour à la normale pour les deux TiO ₂ après 1 an.	Baggs et coll. (1997)
Rats Wistar femelles, voie intratrachéale, TiO ₂ fin (250 nm ; 6 fois 10 mg) ou ultra-fin (21 nm ; 3 fois 10 mg). Sacrifices semaine 129.	Incidence des tumeurs pulmonaires liée à l'inflammation (en nombre de granulocytes ou de macrophages par mm ² de poumon examiné). Seule exception : TiO ₂ ultra-fin (incidence des tumeurs 66 % contre 27 % pour les fines ; 6 % chez les témoins).	Borm et coll. (2000)
Instillation de TiO ₂ UF (20 nm), rats et souris.	Inflammation pulmonaire plus marquée avec les PUF, en lien avec la surface totale. L'âge est un facteur défavorable.	Oberdörster et coll. (2000)
Rats, souris et hamsters femelles exposés à 10, 50 ou 250 mg/m ³ de TiO ₂ fin, ou 0,5, 2, ou 10 mg/m ³ de TiO ₂ UF, 6 h/j, 5 j/sem, 13 sem, périodes sans exposition de 1, 3, 6 ou 12 mois.	Atteintes pulmonaires s'aggravant chez le rat dans le temps après exposition à 250 mg/m ³ seulement. Les souris ont une charge pulmonaire similaire mais des atteintes moins marquées et régressives. Chez les hamsters, l'épuration est très rapide.	Hext et coll. (2002)

Tableau 5.V. Résumé des données animales après inhalation ou instillation pulmonaire de TiO₂ ultra-fin. CB = noir de carbone ; LLBA = liquide de lavage broncho-alvéolaire ; LOAEL = *Lowest Observed Adverse Effect Level* ; MA = macrophages alvéolaires ; MMAD = *Mass Median Aerosol Diameter* (diamètre aérodynamique médian en masse) ; sem = semaine ; UF = ultra-fin(es).

Instillations de TiO ₂ fin (180 nm) ou UF (20-30 nm), hydrophile ou hydrophobe, à doses équivalentes en masse (1 ou 6 mg) ou surface totale (100, 500, 600 ou 3 000 cm ²), rats.	Inflammation pulmonaire et la plupart des indicateurs corrélés à la surface. La surface hydrophobe semble moins active, mais écarts non significatifs. Pas de différences entre échantillons aux fortes doses (6 mg ou ≥ 600 cm ²)	Höhr et coll. (2002)
TiO ₂ (ou CB, Co ₃ O ₄ , ou nickel ; toutes 20 nm, sauf CB, 14 nm) UF, instillation intratrachéale (125 µg), rat Wistar mâle.	L'atteinte pulmonaire (différents indicateurs du LLBA) serait liée à la formation de radicaux libres. TiO ₂ est le moins actif.	Dick et coll. (2003)
Rats femelles, souris ou hamsters. TiO ₂ ultra-fin (33,3 nm), 0,5, 2,0 ou 10 mg/m ³ , 6 h/j, 5 j/sem, pendant 13 semaines ; périodes de récupération de 4, 13, 26 ou 52 semaines (49 semaines pour les hamsters). Surface spécifique du TiO ₂ : 46,9 m ² /g.	Charges pulmonaires liées aux niveaux et durées, similaires pour rats et souris, nettement plus faibles pour les hamsters. Inflammation pulmonaire chez rats et souris. Prolifération métaplasique focale, accumulation de particules interstitielles et fibrose alvéolaire progressive, uniquement chez les rats exposés à 10 mg/m ³ .	Bermudez et coll. (2004)
Rats Wistar mâles instillés (125 ou 500 µg) de CB ou de TiO ₂ , fins (260 ou 250 nm) ou ultra-fins (14,3 ou 29 nm), sacrifiés à 24 h.	À masse égale, les PUF ont induit un plus fort recrutement de polynucléaires, une atteinte plus marquée de l'épithélium pulmonaire. CB était plus actif que TiO ₂ .	Renwick et coll. (2004)
Rats instillés de (2 ou 10 mg/kg), ou exposés par inhalation (4 sem, env. 1 200 mg/m ³) à, différents TiO ₂ (de « base », ou traités en surface). Examens pulmonaires (LLBA, histologie) jusqu'à 3 mois (instillation) ou 1 an après (inhalation).	Pour les deux techniques, seules les particules les plus fortement traitées (alumine ou silice amorphe) produisaient des effets pulmonaires légèrement plus marqués que le TiO ₂ de base. Conclusion : le traitement de surface peut influencer la toxicité pulmonaire des particules de TiO ₂ .	Warheit et coll. (2005)
Rats, nanofibres (diamètre 30 nm, longueur 200 nm) ou nanoparticules (< 30 nm) non traitées de TiO ₂ , ou TiO ₂ fin (env. 270 nm), 1 ou 5 mg/kg.	Pas de différence significative pour l'inflammation pulmonaire (instillations intra-trachéales) après 1 jour, 1 semaine, 1 mois, ou 3 mois.	Warheit (2005), Warheit et coll. (2006)

Tableau 5.V. (suite) Résumé des données animales après inhalation ou instillation pulmonaire de TiO₂ ultra-fin. CB = noir de carbone ; LLBA = liquide de lavage broncho-alvéolaire ; LOAEL = *Lowest Observed Adverse Effect Level* ; MA = macrophages alvéolaires ; MMAD = *Mass Median Aerosol Diameter* (diamètre aérodynamique médian en masse) ; sem = semaine ; UF = ultra-fin(es).

2.2.3. Cancérogenèse chez le rat et transposition éventuelle à l'homme

La cancérogenèse pulmonaire chez le rat ne se produit pas seulement après exposition à des aérosols de TiO₂, mais également avec d'autres aérosols de particules peu solubles et de toxicité aiguë relativement faible, comme des particules diesels, de noir de carbone

ou de talc (Mauderly et coll., 1987 ; NTP, 1993 ; Heinrich et coll., 1995). Cette réponse biologique semble spécifique du rat, hamsters ou souris ne développant pas de tumeurs dans les mêmes conditions. Le mécanisme de cette réponse chez le rat n'est pas expliqué ; des examens d'ensemble des données d'inhalation chronique ont montré que l'incidence des tumeurs pulmonaires est corrélée à la surface totale des particules (Oberdörster et Yu, 1990 ; Driscoll, 1996), ce qui expliquerait pourquoi Heinrich et coll. (1995) en observent à des concentrations et charges pulmonaires plus faibles avec du TiO₂ ultra-fin. Le NIOSH (2005) conclut que ces effets ne semblent pas résulter d'une action directe du TiO₂ mais plutôt d'un mécanisme génotoxique secondaire associé à une inflammation pulmonaire persistante, fonction de la taille de la particule et de sa surface.

Nombre de groupes ou d'auteurs ont avancé des hypothèses pour justifier une non-transposition à l'homme de la cancérogenèse pulmonaire chez le rat observée avec ce type de particules ; aucune pour le moment ne semble privilégiée.

Hext et coll. (2005) estiment que le fait que la clairance moyenne estimée chez l'homme (environ 400 jours, d'après Bailey et coll., 1985) soit nettement plus lente que chez le rat ne le prédispose pas nécessairement à la surcharge pulmonaire puisque, comme le montre le cas des hamsters, d'autres facteurs peuvent jouer un rôle crucial dans la clairance. Si surcharge pulmonaire et clairance réduite ont été effectivement observées chez des mineurs, elles n'étaient pas associées chez l'homme à une inflammation excessive et au développement de tumeurs pulmonaires qui caractérisent la réponse du rat dans les mêmes conditions. De plus, dans une comparaison effectuée par Nikula et coll. (1997) entre rats et singes exposés à des particules de charbon ou à des émissions diesels, d'importantes différences apparaissaient, à savoir que les rats renaient une plus forte proportion de particules dans la lumière des bronchioles alvéolaires et les alvéoles, tandis que les singes présentaient une plus forte rétention interstitielle. De telles différences ont été confirmées (Nikula et coll., 2001) entre rats et mineurs (fumeurs ou non) plus ou moins fortement exposés. Ces derniers présentaient bien une rétention interstitielle préférentielle (de l'ordre de 60 à 90 %, selon niveaux d'exposition), ce qui peut amener, entre ces espèces, des cellules différentes au contact des particules retenues, et donc des réponses différentes. Churg et Brauer (1997), analysant par microscopie électronique les particules retenues dans le segment apical supérieur du parenchyme pulmonaire humain (autopsie de 10 non-fumeurs habitant Vancouver), ont trouvé des particules de diamètre géométrique global 380 nm, les plus grosses (diamètre géométrique 490 nm) étant de la silice et des silicates, et les plus fines (diamètre géométrique 170 nm) recelant des éléments métalliques. Les PUF vraies (< 100 nm), essentiellement de type métallique, constituaient moins de 5 % du total. La transposition en diamètres aérodynamiques révélait que 96 % des particules étaient de diamètre inférieur à 2,5 µm, montrant ainsi que le parenchyme pulmonaire humain retient efficacement les PM_{2,5}.

D'autres avancent que si la réponse chez l'homme était comparable à celle observée pour le rat, l'incidence des cancers pulmonaires humains serait nettement plus élevée (exemple des noirs de carbone, Valberg et Watson, 1996). D'autres encore avancent que certaines tumeurs relevées chez le rat (*Proliferative keratin cyst*) ne sont pas observées chez l'homme, et ne sont pas réellement prolifératives comme leur dénomination peut le donner à penser (Carlton, 1994 ; Mauderly, 1994 ; MIT toxicology symposium, 1995 ; Schultz, 1996). D'autres enfin s'appuient sur les différences de tailles entre macrophages alvéolaires chez ces deux espèces pour considérer que le MA humain devrait être nettement moins facilement surchargé que celui du rat.

À noter cependant qu'à côté de quelques cas rapportés de poumons chargés de particules de TiO_2 (Humble et coll., 2003 ; Rode et coll., 1981 ; Maatta et Arstila, 1975), parfois avec fibrose (Humble et coll., 2003 ; Yamadori et coll., 1986), un cas a été rapporté mentionnant un adénocarcinome pulmonaire chez un homme fortement exposé au TiO_2 (Yamadori et coll., 1986) ; les auteurs pensent que ce cancer était une pure coïncidence. Le Centre international de recherche contre le cancer a conclu en 1989 (IARC, 1989) que les indications en faveur d'un éventuel potentiel cancérigène du TiO_2 étaient inadéquates pour l'homme, et limitées chez l'animal. Lors de la mise à jour de son examen, en 2006, le CIRC (IARC, 2006) a classé TiO_2 en catégorie 2B (potentiellement cancérigène pour l'homme).

2.2.4. Toxicologie humaine de TiO_2 ultra-fin

Aucune donnée n'a été trouvée.

2.2.5. Valeur limite d'exposition professionnelle à TiO_2

Comme rappelé dans le chapitre relatif à une éventuelle fixation de valeurs limites pour l'ensemble des PUF (chapitre 9), Muhle (1993) a préconisé, après extrapolation de données expérimentales et humaines relatives à la surcharge pulmonaire, une VME de $0,8 \text{ mg/m}^3$ (fraction alvéolaire) pour l'ensemble des aérosols de substances peu solubles et faiblement toxiques. Il soulignait que cette proposition n'était pas applicable aux PUF ; dans le cas de TiO_2 ultra-fin, en tenant compte de sa plus grande surface spécifique, la VLEP (alvéolaire) devrait être, selon lui, de $0,4 \text{ mg/m}^3$.

Après avoir estimé qu'une charge pulmonaire inférieure à 4 mg/g de poumon ne perturberait pas la clairance par effet de surcharge, le sous-comité « fumées et écrans militaires » de la Commission des sciences de la vie du National Research Council (1999) en déduit une valeur limite d'exposition (REGL, *Repeated Exposure Guidance Level*) égale à $2,0 \text{ mg/m}^3$ de TiO_2 (8 heures par jour, 5 jours par semaine). Cette

évaluation repose sur des hypothèses qualifiées de « raisonnables » : ventilation pulmonaire 22 l/min, pourcentage de dépôt des particules alvéolaires 35 %, poids des poumons 1 000 g, clairance moyenne 500 jours ; elle tient compte de la densité du TiO_2 . Elle tient compte également des incertitudes des dosimétries pulmonaires chez les rats et les humains ; aucun facteur d'extrapolation n'a donc été introduit. Aucun autre facteur d'incertitude n'a été utilisé, le rat étant plus sensible que l'homme. Le sous-comité estime avoir de cette manière suivi une démarche analogue à celle de l'ACGIH (1996) dans son évaluation des valeurs limites applicables aux *Particulates Not Otherwise Classified* (et cela, bien que l'ACGIH ait retenu pour TiO_2 la valeur limite de 10 mg/m³ pour la fraction inhalable, et aucune pour la fraction alvéolaire).

Bien que conscient que les expositions à TiO_2 dans ce contexte militaire impliquent des particules fines (0,1 à 2,5 µm, surface totale typique estimée à 6-8 m²/g), le sous-comité n'ignore pas l'existence de PUF de TiO_2 (surface spécifique de l'ordre de 50 m²/g). Dans les cas d'expositions à des PUF, la valeur limite correspondante devrait logiquement, selon le sous-comité, être abaissée du facteur 8 correspondant au rapport de ces surfaces (soit une VLEP PUF de TiO_2 de 0,25 mg/m³).

Selon les résultats de Warheit et coll. (2005), il faudrait également tenir compte des traitements de surface dans la fixation de VLEP à des TiO_2 ayant reçu des traitements de surface différents, mais d'une part ces résultats, obtenus dans des conditions un peu particulières (exposition par inhalation à des concentrations extrêmes, ou instillation pulmonaire) demandent confirmation, d'autre part ils se rapportent à des formulations inhabituelles (qui ne devraient pas en principe être rencontrées sur les lieux de travail usuels, sous réserve de vérification) et, enfin, ils n'ont mis en évidence que des différences d'effets qualifiées de mineures. Il faudrait de plus que les traitements de surface appliqués à TiO_2 soient dûment identifiés, quantitativement importants et suffisamment durables pour en tenir compte et, à supposer que l'on dispose de ces informations, il resterait à apprécier quantitativement leur répercussion sur une éventuelle adaptation de la valeur limite.

Une publication du NIOSH (2005), encore sous forme de projet, recommande des valeurs limites de 1,5 mg/m³ (TiO_2 fin) ou 0,1 mg/m³ (TiO_2 ultra-fin ; fraction alvéolaire dans le premier cas, particules de taille inférieure à 100 nm dans le second), valeurs qui devraient réduire un éventuel risque de cancérogenèse pulmonaire chez l'homme à moins de 10⁻³. La plus faible valeur recommandée pour le TiO_2 ultra-fin est justifiée par le NIOSH par sa plus grande surface spécifique.

Enfin, Kuempel et coll. (2006) ont évalué la VLEP pour l'homme par extrapolation à partir de données dose-réponse chez le rat. Les valeurs limites de moyenne d'exposition calculées pour un risque d'excès de cancer pulmonaire de 0,1 % chez l'homme seraient, suivant le modèle utilisé, de 0,07 à 0,3 mg/m³ pour le TiO_2 ultra-fin, et de 0,7 à 1,3 mg/m³ pour le TiO_2 fin. Ces auteurs soulignent que les modèles devraient être à la fois plus complets (par exemple en incluant la translocation) et mieux validés.

Ces différentes approches sont résumées dans le tableau 5.VI, ci-après.

Origine de la proposition	TiO ₂ fin	TiO ₂ ultra-fin
Muhle (1993)	0,8	0,4
National Research Council (1999)	2	0,25
NIOSH (2005)	1,5	0,10
Kuempel et coll. (2006)	0,7-1,3	0,07-0,3

Tableau 5.VI. Valeurs limites d'exposition professionnelle à long terme (mg/m³) préconisées pour TiO₂ fin ou ultra-fin. Dans les trois cas, le passage de la première à la seconde valeur s'appuie sur les différences de surface spécifique. La proposition du NIOSH figure dans un document en cours d'élaboration et de discussion ; elle pourrait donc évoluer.

Conclusion

Des travaux exposés précédemment ressortent les points principaux suivants :

- le TiO₂ ultra-fin est – à masse égale – plus biologiquement actif (toxicologie pulmonaire) que le TiO₂ fin. L'opinion contraire exprimée par Tsuji et coll. (2006), suite à une expérimentation à court terme et par instillation intratrachéale, nécessite d'être étayée avant de remettre en cause des données obtenues par inhalation sur le long terme (Bermudez et coll., 2004, 2002) ;
- les résultats sont plus homogènes pour de nombreux indicateurs de toxicité pulmonaire lorsque les comparaisons sont effectuées à surfaces égales ;
- le revêtement de surface des TiO₂ semble ne présenter qu'une influence limitée sur leurs propriétés toxicologiques. Par ailleurs on ignore généralement : 1) la nature exacte et l'importance des traitements appliqués ; 2) quelle proportion de la surface des particules est réellement couverte ; 3) l'existence et l'influence d'éventuelles contaminations ultérieures à la fabrication (traces de métaux, de substances organiques) ;
- la taille de la particule module ses propriétés, notamment pour : 1) la translocation (plus la particule est fine, plus la translocation dans l'épithélium pulmonaire est importante) ; 2) la demi-vie pulmonaire (d'autant plus longue que la particule est plus petite) ; 3) les propriétés toxicologiques chez le rat (notamment cancers pulmonaires) ;
- la rapidité d'administration joue également un rôle dans la translocation (ce qui peut avoir de l'importance en cas d'exposition massive de courte durée) ;

- la forme de la particule est importante (des fibres sont plus actives que des particules plus ou moins isométriques ; Watanabe et coll., 2002 ; Hirano et coll., 2000 ; Ishihara et coll., 1999) ;
- *in vitro*, la phase cristalline du TiO_2 joue un rôle important sur sa cytotoxicité, l'anatase étant de l'ordre de 100 fois plus toxique que le rutile ; bien que moindre, cette cytotoxicité peut s'exprimer en l'absence de rayonnement lumineux ;
- chez l'homme, aucune étude toxicologique ne fournit d'indication valable d'une éventuelle cancérogénicité pulmonaire du TiO_2 fin par inhalation. Il n'y a pas de données relatives au TiO_2 ultra-fin.

Les publications de Lee et coll. (1985b, 1986) – et celles qui s'y rattachent par un recours à des concentrations extrêmes de TiO_2 (50 mg/m³ et plus) – ont créé une « onde de choc » qui n'est toujours pas amortie, en montrant que des rats, jusqu'alors considérés comme un modèle toxicologique plus ou moins acceptable pour l'homme, développaient, dans ces conditions peu représentatives des expositions humaines usuelles, des cancers pulmonaires. La notion de « poussière inerte » ou simplement « gênante », catégorie dans laquelle était classé TiO_2 , en a été également remise en cause. L'échec de la mise au jour des mécanismes d'une telle cancérogenèse fait que, malgré une acceptation plutôt générale de la non-pertinence probable de la transposition du rat à l'homme (ILSI, 2000), il convient de rester prudent (Oberdörster, 1996 ; Borm et coll., 2004).

La mise en évidence que nombre de réponses biologiques deviennent plus cohérentes entre espèces et niveaux d'exposition lorsque la charge pulmonaire est exprimée en surface totale des particules retenues par gramme de poumon constitue l'émergence d'une approche toxicologique globale. Cette dernière ne doit cependant pas être surévaluée, les phénomènes de surface impliqués n'étant pas nécessairement les mêmes entre espèces chimiques différentes (formation de radicaux libres, sites réactifs, présence de métaux de transition adsorbés et biodisponibles, potentiel dzêta, etc.), voire « identiques » (même substance, mais traitements de surface différents, histoire différente... voir chapitre 1, point 4 ; chapitre 7, point 1). Dans certains cas, le recours à ce paramètre magnifie au contraire les différences entre deux polluants (comparaisons entre TiO_2 et la poussière volcanique de Montserrat, nombre de PMN, Cullen et coll., 2002, pp. 27-28).

Enfin, il convient de ne pas oublier que l'on ne dispose d'aucune donnée relative à la santé de personnes qui seraient exposées principalement à des particules ultra-fines de TiO_2 . La fixation dans ce cas d'une valeur limite d'exposition professionnelle abaissée d'un facteur 8, correspondant globalement au rapport moyen des surfaces totales, semble une orientation acceptable de prévention, en attendant des données objectives plus nombreuses et plus sûrement applicables à l'homme.

Une autre option serait, comme exposé dans le chapitre relatif à la fixation de valeurs limites pour l'ensemble des PUF (chapitre 9), de s'orienter pour le TiO_2 ultra-fin vers

une valeur en nombre de particules par centimètre cube. En dépit des difficultés techniques qu'il implique, ce choix permettrait de mettre rapidement en œuvre des mesures de prévention fondées sur des données objectives, en attendant que les données toxicologiques et les progrès métrologiques en confirment ou non la pertinence ; il paraîtrait en tout cas inconséquent de ne prendre aucune mesure de précaution.

Bibliographie

- ACGIH (1996). Guide to Occupational Exposure Values—1996. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, Ohio.
- Anonyme (2004). Cf. http://www.pcimag.com/CDA/ArticleInformation/features/BNP___Features__Item/0,1846,126898,00.html. Posted on: 06/01/2004.
- Baggs RB, Ferin J, Oberdörster G (1997). Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet Pathol* **34** (6) 592-597.
- Bailey MR, Fry FA, James AC (1982). The Long-Term Clearance Kinetics Of Insoluble Particles From The Human Lung. *Annals Occup Hyg* **26**(1-4) 273-290.
- Beaumont JJ, Sandy MS, Sherman CD (2004). Titanium dioxide and lung cancer. Letter to the editor. *J Occup Environ Med* **46**(8) 759-760.
- Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2002). Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* **70**(1) 86-97.
- Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* **77** (2) 347-357.
- Bickley RI, Gonzalez-Carreno T, Lees JS, Palmisano L, Tilley RJD (1991). A structural investigation of titanium dioxide photocatalysts. *J Solid State Chem* **92**(1) 178-190.
- Boffetta P, Gaborieau V, Nadon L, Parent MF, Weiderpass E, Siemiatycki J (2001). Exposure to titanium dioxide and risk of lung cancer in a population-based study from Montreal. *Scand J Work Environ Health* **27**(4) 227-232.
- Boffetta P, Soutar A, Cherrie JW, Granath F, Andersen A, Anttila A, Blettner M, Gaborieau V, Klug SJ, Langard S, Luce D, Merletti F, Miller B, Mirabelli D, Pukkala E, Adami HO, Weiderpass E (2004). Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe. *Cancer Causes Control* **15**(7) 697-706.
- Borm PJ, Höhr D, Steinfartz Y, Zeitträger I, Albrecht C (2000). Chronic inflammation and tumor formation in rats after intratracheal instillation of high doses of coal dusts, titanium dioxides, and quartz. *Inhal Toxicol* **12** (Suppl. 3) 225-231.
- Borm P, Schins R, Albrecht C (2004). Inhaled particles and lung cancer, part B: Paradigms and risk assessment. *Internat J Cancer* **110**(1) 3-14.
- Carlton WW (1994). "Proliferative keratin cyst", a lesion in the lungs of rats following chronic exposure to para-aramid fibrils. *Fundam Appl Toxicol* **23**, 304-307.
- Chen JL, Fayerweather WE (1988). Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide. *J Occup Med* **30**, 937-942.

- Churg A, Brauer M (1997). Human lung parenchyma retains PM_{2.5}. *Am J Respir Crit Care Med* **155**(6) 2109-2111.
- Creutzenberg O, Bellmann B, Heinrich U, Fuhst R, Koch W, Muhle H (1990). Clearance and retention of inhaled diesel exhaust particles, carbon black, and titanium dioxide in rats at lung overload conditions. *J Aerosol Sci* **21** (Suppl. 1) S455-S458.
- Cullen RT, Jones AD, Miller BG, Tran CL, Davis JMG, Donaldson K, Wilson M, Stone V, Morgan A (2002). Toxicity of volcanic ash from Montserrat. IOM Research Report TM/02/01, April 2002.
- Cunningham M, Magnuson SR, Falduto MT (2005). Gene expression profiling of nanoscale materials using a systems biology approach. *Toxicologist*, résumé n° 45 (page 9).
- Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* **15**(1) 39-52.
- Driscoll KE (1996). Role of inflammation in the development of rat lung tumors in response to chronic particle exposure. *Inhal Toxicol* **8**, 139-153.
- Driscoll KE, Maurer JK (1991). Cytokine and growth factor release by alveolar macrophages: Potential biomarkers of pulmonary toxicity. *Toxicol Pathol* **19** (4 Pt 1) 398-405.
- Ferin J, Oberdörster G, Penney DP (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**(5) 535-542.
- Frazer L (2001). Titanium dioxide: environmental white knight? *Environ Health Perspect* **109**(4) A174-A177.
- Fryzek JP, Chadda B, Marano D, White K, Schweitzer S, McLaughlin JK, Blot WJ (2003). A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States. *J Occup Environ Med* **45**(4) 400-409.
- Garabrant DH, Fine LJ, Oliver C, Bernstein L, Peters JM (1987). Abnormalities of pulmonary function and pleural disease among titanium metal production workers. *Scand J Work Environ Health* **13**(1) 47-51.
- Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K (1995). Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol* **4**, 533-556.
- Hext PM, Tomenson JA, Thompson P (2006). Response to Iavicoli and Carelli (The assessment of titanium dioxide exposure. Letter to the editor, *Occup Hyg* **50**(2) 205). *Ann Occup Hyg* **50**(2) 207-208.
- Hext PM, Tomenson JA, Thompson P (2005). Titanium dioxide: inhalation toxicology and epidemiology. *Ann Occup Hyg* **49**(6) 461-472.
- Hext PM, Warheit DB, Mangum J, Asgharian B, Wong B, Bermudez E, Everitt J (2002). Comparison of the Pulmonary Responses to Inhaled Pigmentary and Ultrafine Titanium Dioxide Particles in the Rat, Mouse and Hamster. *Ann Occup Hyg* **46** (Suppl. 1), 191-196.
- Hirano S, Anuradha CD, Kanno S (2000). Transcription of *krox-20/egr-2* is upregulated after exposure to fibrous particles and adhesion in rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**(3) 313-319.
- Höhr D, Steinfartz Y, Schins RP, Knaapen AM, Martra G, Fubini B, Borm PJ (2002). The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *Int J Hyg Environ Health* **205**(3) 239-244.

- Humble S, Allan Tucker J, Boudreaux C, King JA, Snell K (2003). Titanium particles identified by energy-dispersive X-ray microanalysis within the lungs of a painter at autopsy. *Ultrastruct Pathol* **27**(2) 127-129.
- Hurum DC, Agrios AG, Gray KA (2003). Explaining the Enhanced Photocatalytic Activity of Degussa P25 Mixed-Phase TiO₂ Using EPR. *J. Phys. Chem B* **107**(19) 4545-4549.
- IARC (1989). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Titanium dioxide. Vol. 47, pp 307-326.
- IARC (2006). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Titanium dioxide (Group 2B). Vol. 93.
- ILSI (2000). International Risk Science Institute. The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhal Toxicol* **12**(1-2) 1-17.
- Ishihara Y, Kyono H, Kohyama N, Otaki N, Serita F, Toya T, Kagawa J (1999). Acute biological effects of intratracheally instilled titanium dioxide whiskers compared with nonfibrous titanium dioxide and amosite in rats. *Inhal Toxicol* **11**(2) 131-149.
- Janssen YM, Marsh JP, Driscoll KE, Borm PJ, Oberdörster G, Mossman BT (1994). Increased expression of manganese-containing superoxide dismutase in rat lungs after inhalation of inflammatory and fibrogenic minerals. *Free Radic Biol Med* **16**(3) 315-322.
- Kuempel ED, Tran CL, Castranova V, Bailer AJ (2006). Lung Dosimetry and Risk Assessment of Nanoparticles: Evaluating and Extending Current Models in Rats and Humans. *Inhal Toxicol* **18**(10) 717-724.
- Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF (1985a). Transmigration of titanium dioxide (TiO₂) particles in rats after inhalation exposure. *Exp Mol Pathol* **42**(3) 331-43.
- Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF (1985b). Pulmonary response of rats exposed to Titanium Dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol Appl pharmacol* **79**, 179-192.
- Lee KP, Henry III NW, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF (1986). Pulmonary response to impaired lung clearance in rats following excessive titanium dioxide dust deposition. *Environ Res* **41**, 144-167.
- Lison D, Lardot C, Huaux F, Zanetti G, Fubini B (1997). Influence of particle surface area on the toxicity of insoluble manganese dioxide dusts. *Arch Toxicol* **71**(12) 725-729.
- Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B (2006). Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. *Environ Sci Technol* **40**(14) 4346-4352.
- Maatta K, Arstila AU (1975). Pulmonary deposits of titanium dioxide in cytologic and lung biopsy specimens. Light and electron microscopic x-ray analysis. *Lab Invest* **33**(3) 342-346.
- Mauderly JL, Jones RK, Griffith WC, Henderson RF, McClellan RO (1987). Diesel exhaust is a pulmonary carcinogen in rats exposed chronically by inhalation. *Fundam Appl Toxicol* **9**, 208-221.
- Mauderly JL, Snipes MB, Barr EB, Belinsky SA, Bond JA, Brooks AL, Chang JY, Cheng YS, Gillett NA, Griffith WC, Henderson RF, Mitchell CE, Nikula KJ, Thomassen DG (1994). Pulmonary toxicity of inhaled diesel exhaust and carbon black in chronically exposed rats. Part I: neoplastic and nonneoplastic lung lesions. Health Effects Institute research report number 68, october 1994 (96 pages).
- MIT Toxicology symposium (March 29 & 30, 1995): "Particle overload in the rat lung and lung cancer: relevance for human risk assessment".

- Muhle H (1993). Dusts and OELs. Background document prepared for the Scientific expert group on occupational exposure limits. SEG/KEY/11, August 1993, 46 pages.
- National Research Council (1999). Commission on Life Sciences, Subcommittee on Military Smokes and Obscurants. Toxicity of Military Smokes and Obscurants, Volume 2, 139 pages. <http://www.nap.edu/catalog/9621.html>
- Nikula KJ, Avila KJ, Griffith WC, Mauderly JL (1997). Lung tissue responses and sites of particle retention differ between rats and cynomolgus monkeys exposed chronically to diesel exhaust and coal dust. *Fundam Appl Toxicol* **37(1)** 37-53.
- Nikula KJ, Vallyathan V, Green FHY *et al* (2001). Influence of exposure concentration or dose on the distribution of particulate material in rat and human lungs. *Environ Health Perspect* **109(4)** 311-318.
- NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) (2005). Evaluation of Health Hazard and Recommendations for Occupational Exposure to Titanium Dioxide. NIOSH Current Intelligence Bulletin (Draft), November 22, 2005, 158 pages. <http://www.cdc.gov/niosh/docs/preprint/tio2/pdfs/TIO2Draft.pdf>
- NTP (National Toxicology Program) (1993). TR-421 Toxicology and Carcinogenesis Studies of Talc (CAS No (14807-96-6) (Non-Asbestiform) in F344/N Rats and B6C3F1, Mice (Inhalation Studies). TR-421. National Institute of Environmental Health Sciences, National Toxicology Program, Research Triangle Park, N.C. Available from NTIS, Springfield, Va, Doc. No. PB94-215985.
- Oberdörster G, Yu CP (1990). The carcinogenic potential of inhaled diesel exhaust: A particle effect? *J Aerosol Sci* **21 (Suppl. 1)**, 397-401.
- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE (1994a). Correlation between particle size, *in vivo* particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* **102 (Suppl. 5)**, 173-179.
- Oberdörster G, Ferin J, Soderholm S, Gelein R, Cox C, Baggs R, Morrow PE (1994b). Increased pulmonary toxicity of inhaled ultrafine particles: Due to lung overload alone? *Ann Occup Hyg* **38 (Suppl. 1)** 295-302.
- Oberdörster G (1996). Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhal Toxicol* **8 (Suppl.)** 73-89.
- Oberdörster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, Elder AC (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* 96, 5-74; disc. 75-86.
- Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss DG, Schiffmann D (2002). Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect* **110(8)** 797-800.
- Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* **61(5)** 442-447.
- Rode LE, Ophus EM, Gylseth B (1981). Massive pulmonary deposition of rutile after titanium dioxide exposure: Light-microscopical and physico-analytical methods in pigment identification. *Acta Pathol Microbiol Scand* **89**, 455-461.
- Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL (2006). Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci.* **92(1)** 174-185.

- Schultz M (1996). Comparative pathology of dust-induced pulmonary lesions: significance of animal studies to humans. *Inhal Toxicol* **8**, 433-456.
- Takenaka S, Dornhofer-Takenaka H, Muhle H (1986). Alveolar Distribution of Fly Ash and of Titanium Dioxide after Long-Term Inhalation by Wistar Rats. *J Aerosol Sci* **17**(3) 361-364.
- Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD, Donaldson K (2000). Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal Toxicol* **12**(12) 1113-1126.
- Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, Santamaria AB (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci.* **89**(1) 42-50.
- Valberg PA, Watson AY (1996). Lung cancer rates in carbon-black workers are discordant with predictions from rat bioassay data. *Reg Toxicol Pharmacol* **24**, 155-170.
- Warheit DB (2005). Impact of exposures to nanoparticles on respiratory health. Particle size may not be more important than surface characteristics. *Toxicologist*, résumé n° 651 (page 133) ; voir également Warheit DB, Reed K, Webb T, Sayes C, Colvin V. Pulmonary toxicity screening studies with nano vs. fine-sized quartz and TiO₂ particles in rats. Même ouvrage, résumé n° 1043 (page 213).
- Warheit DB, Brock WJ, Lee KP, Webb TR, Reed KL (2005). Comparative Pulmonary Toxicity Inhalation and Instillation Studies with Different TiO₂ Particle Formulations: Impact of Surface Treatments on Particle Toxicity. *Toxicol Sci* **88**(2) 514-524.
- Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL (2006). Pulmonary Instillation Studies with Nanoscale TiO₂ Rods and Dots in Rats: Toxicity is not Dependent Upon Particle Size and Surface Area. *Toxicol Sci* **91**(1) 227-236.
- Watanabe M, Okada M, Kudo Y, Tonori Y, Niitsuya M, Sato T, Aizawa Y, Kotani M (2002). Differences in the effects of fibrous and particulate titanium dioxide on alveolar macrophages of Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health A* **65**(15) 1047-1060.
- Yamadori I, Ohsumi S, Taguchi K (1986). Titanium dioxide deposition and adenocarcinoma of the lung. *Acta Pathol Jpn* **36**(5) 783-790.

3. Silices amorphes

B. Courtois

Introduction

Le terme « silice » désigne le dioxyde de silicium (SiO₂) sous ses différentes formes, y compris cristallines (par exemple quartz ou cristobalite), microcristallines (terres de diatomées), vitreuses, et amorphes. La silice constitue globalement quelque 60 % en masse de la croûte terrestre, telle quelle ou associée à d'autres oxydes (innombrables silicates). Du point de vue technique, c'est le matériau de base des verres, des céramiques et des réfractaires ; elle est encore un élément essentiel des matériaux de construction et la source du silicium élémentaire.

La diversité des formes et des propriétés des silices amorphes a conduit à une grande diversité d'utilisations, notamment comme adsorbants, charges, agents de renforcement, supports de catalyseur. Elles sont utilisées en formulations liquides ou solides, et avec de larges variations d'hydratation ou d'hydroxylation. Les silices colloïdales (sols) sont des dispersions stables de particules de silice amorphe en suspension dans un liquide, généralement l'eau. Les formes solides (poudres) peuvent être classées selon leur mode de préparation, soit en milieu humide (silices précipitées, silicagels) soit à haute température (pyrogénées).

Les propriétés toxicologiques des silices sont liées à leurs propriétés physicochimiques (surface, impuretés, degré de cristallinité, granulométrie... ; Guthrie et Heaney, 1995 ; Fubini, 1998a, 1998b ; Fubini et coll., 2004), elles-mêmes fonction du type de l'échantillon, de son degré de division et des traitements appliqués. Il importe donc de relever avec soin un maximum des caractéristiques propres aux silices examinées, ce qui est trop rarement fait dans les publications. Une autre difficulté est celle de la présence, parfois difficile à mettre en évidence, de silice cristalline, dont les propriétés toxicologiques risquent de fausser les observations et les conclusions.

Ce chapitre traite uniquement des silices amorphes synthétiques ou sous-produits de la métallurgie ; les silices amorphes naturelles (diatomites) sont en effet de composition complexe et contiennent des impuretés, parmi lesquelles la silice cristalline (Merget et coll., 2002). Par ailleurs, elles ne peuvent être considérées comme des particules ultra-fines, leur diamètre se situant entre 0,75 et 1 000 μm ; leur surface spécifique est généralement de l'ordre de 10 à 20 m^2/g (Engh, 2001).

La réactivité des silices amorphes à haute surface spécifique est conditionnée par la teneur en groupes silanol superficiels, dont jusqu'à la moitié peut subsister même après chauffage à 400 °C. Les silices ultra-fines sont produites et utilisées depuis des décennies. Elles font donc partie des quelques PUF pour lesquelles des données toxicologiques sont disponibles, sur lesquelles il a semblé utile de faire le point.

3.1. Silices amorphes synthétiques

3.1.1. Modes de production

Il existe cinq principaux types de silices amorphes synthétiques, dont les modes de fabrication sont résumés dans le tableau 5.VII ci-après (Chevallier 1990 ; Waddell et coll., 1997 ; SL, 2001).

Les silices précipitées et pyrogénées sont susceptibles de recevoir des traitements chimiques modifiant leurs propriétés de surface. Le plus courant met en œuvre des chlorosilanes, modifiant les groupements silanol superficiels et conférant à la silice une faible

Types de silice amorphe synthétique	Préparation typique et caractéristiques générales
Silices précipitées Production mondiale 900 kt en 2001	Ajout d'un acide (souvent sulfurique) à une solution de silicate de sodium de pH > 7, obtenue soit par fusion alcaline à 1 200 °C de sable naturel, soit par action de soude sur du sable à 140 °C. Filtration, séchage et parfois broyage. Solubles à pH > 9. Surface spécifique 20 à 600 m ² /g. Hydrophiles (groupements silanol superficiels). Perte au feu 5 à 14 % suivant la fabrication. Granulométrie 50 µm à 2 mm (non broyées), < 10 µm (broyées).
Silices pyrogénées* (ou de pyrohydrolyse) Production mondiale 115 kt en 1996	Hydrolyse de SiCl ₄ à 1 000 °C et élimination du HCl formé. La surface spécifique est contrôlée par les conditions de la combustion. Ces silices sont faiblement hydrophiles. Surface spécifique de 50 à 400 m ² /g, non microporeuses. Pureté très élevée, peu hygroscopiques. pH < 7.
Gels de silice Production mondiale 93 kt en 1996	Ajout d'un acide à une solution de silicate de sodium de pH < 7, formant un hydrogel (suspension de très fines particules). Filtrage et obtention d'un « xérogel » (séchage et frittage) ou d'un « aérogel » (séchage sans frittage). Surface spécifique soit élevée (700 m ² /g) avec grande capacité d'absorption d'eau, soit réduite (env. 300 m ² /g). Puretés élevées. PH 5 à 8.
Silices à l'arc Production mondiale 150 kt en 1996	Fusion de sable très pur à l'arc électrique (environ 2 000 °C, 15 heures) et broyage des lingots. Très pures (> 99,8 % de SiO ₂ en masse) et de surface spécifique réduite (< 50 m ² /g).
Silices colloïdales (« sols ») Production mondiale 44 kt en 1996	Plusieurs modes complexes de préparation, à partir de suspensions aqueuses diluées et stables de micro-particules. On peut également ajouter un acide à une solution de silicate, mais le sel de l'acide est souvent gênant. Microbilles de 10 à 100 nm en suspension ; pH 8,5 à 9,5.

Tableau 5.VII. Silices amorphes synthétiques et leurs préparations. Les conditions concrètes d'obtention (acide ou sel utilisé, conditions de séchage, etc.) ont une forte influence sur les propriétés finales du produit.

* Les silices pyrogénées sont souvent désignées par leurs dénominations commerciales principales, par exemple Aérosil (Degussa) ou Cab-O-Sil (Cabot).

teneur en carbone – de l'ordre du pour cent – et un caractère hydrophobe. D'autres types de traitement n'impliquent pas de liaison chimique entre la silice et les produits utilisés, c'est en particulier le cas du recouvrement par des cires, qui peut concerner des silices précipitées ou sous forme de gels, et qui permet notamment d'améliorer la dispersion dans des liquides.

3.1.2. Propriétés physicochimiques

Les principales caractéristiques des silices pyrogénées, précipitées, ou sous forme de gels ou colloïdes, sont données dans le tableau 5.VIII (Ferch 1996 ; Waddell et coll., 1997).

	Pyrogénées	Précipitées	Gels de silice	Silice colloïdale
SiO ₂ (%)	98,3-99,8	85-95	96,5-99,6	15-50
Surfaces spécifiques (BET, m ² /g)	35-400	25-800	200-1 000	50-750
Pertes au séchage (%)	< 2,5	3-7	3-6	50-80
pH	3,5-5	5-9	2,3-7,4	3-5, 8-11
Densité apparente (g/cm ³)	0,03-0,15	0,03-3	0,1-1	1,2-1,4
Densité (g/cm ³)	2,2	1,9-2,1	2,0-2,22	2,2-2,3
Perte au feu (%)	1-4	10-14	2-17,5	50-90
Densité des groupes silanol (SiOH/nm ²)	2,5-3,5	5-6	5-6	-
Taille des particules primaires (nm)	5-50	5-100	1-100	4-60
Tailles des agrégats (μm)	< 1	0,1-40	1-20	n. a.*
Tailles des agglomérats (μm)	1-100	1-100	n. a.*	n. a.*
Taille des pores (nm)	-	> 30	2-20	-
Distribution de la taille des pores	-	Très large	Étroite	-

Tableau 5.VIII. Principales propriétés des silices synthétiques. * n. a. : non applicable.

Les différences entre les silices synthétiques tiennent à leur morphologie et à leur chimie de surface. La taille des particules des silices à l'arc dépend du broyage ; ce ne sont pas majoritairement des particules ultra-fines.

Les silices pyrogénées présentent des agrégats sous formes de chaînes, avec pas ou très peu de porosité interne. Les agrégats des silices précipitées sont plus compacts et présentent une porosité interne importante. Les gels de silices montrent la plus forte porosité interne en raison de leur structure tridimensionnelle complexe.

Le nombre de fonctions silanol (SiOH) est environ deux fois plus grand pour les gels et les silices précipitées que pour les silices pyrogénées. Ces dernières présentent une plus forte proportion de fonctions libres (non impliquées dans une liaison hydrogène avec une autre fonction silanol de la surface) que les silices obtenues par voie humide.

La solubilité dans l'eau des silices amorphes, faible, est fonction de la taille des particules, de la température, du degré d'hydratation et des impuretés présentes (notamment fer ou aluminium). Elle est indépendante du pH en dessous de pH 9, mais augmente aux pH supérieurs.

3.1.3. Applications des silices synthétiques

Les principales applications des silices précipitées sont les suivantes :

- pneumatiques : 25 % ;
- semelles de chaussures et pièces techniques en élastomères : 25 % ;
- dentifrices : 20 % ;
- alimentation humaine et animale : 15 % ;
- autres (séparateurs de batteries, peintures, papiers, pharmacie...) : 15 %.

Dans les dentifrices, les silices amorphes augmentent la viscosité et apportent un pouvoir abrasif. Dans l'alimentation humaine et animale, elles sont utilisées à la fois comme support d'acidifiant, de vitamines ou de matières grasses, et comme agent d'écoulement ou anti-mottant.

Après traitement destiné à les rendre hydrophobes, elles peuvent également être utilisées comme agents anti-mousse, ou pour la protection de poudres contre l'humidité.

La principale application des gels de silice reste l'absorption d'humidité ; ils sont également utilisés dans les peintures et vernis comme agent de matité, et dans les papiers.

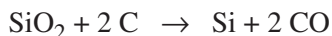
Les silices colloïdales sont utilisées comme liants dans des matériaux réfractaires, dans l'agroalimentaire comme agents de clarification des vins et boissons, dans la fonderie de précision pour la réalisation de moules et dans les industries du textile et du papier.

Les silices à l'arc sont principalement utilisées dans des réfractaires et comme charges de résines époxy.

3.2. Silices amorphes sous-produits de la métallurgie (fumées de silice)

3.2.1. Origine et utilisation des fumées de silice

Les fumées de silice sont produites secondairement lors de la fabrication du silicium et de ses alliages (ferro-siliciums, fer-chrome-silicium, silicium-manganèse, calcium-silicium...) dans des fours à arc électrique, où le quartz est réduit par du carbone selon la réaction :



Une partie du silicium formé est vaporisée sous forme de monoxyde (SiO), dont les vapeurs se condensent en sortie de four et s'oxydent sous forme de micro-sphères de silice. Jusqu'en 1985, ces « poussières » ont d'abord été rejetées dans l'atmosphère puis, pour protéger l'environnement, récupérées par filtration et placées en décharge. La production mondiale actuelle est estimée à 600 000 t/an.

Les fumées de silice sont principalement utilisées dans des bétons à hautes performances, où elles ont le double rôle d'optimiser la compacité de l'empilement granulaire et de réagir avec une partie de la chaux hydratée pour former des gels hydratés de silicate de calcium.

3.2.2. Propriétés physicochimiques des fumées de silice

Kolderup (1977) a étudié la distribution granulométrique de particules émises par un four à ferro-silicium. Celle-ci n'était pas globalement log-normale, mais semblait telle dans les intervalles de 0,02 à 0,1 µm (où l'on observe principalement des particules sphériques primaires) et de 0,4 à 1 µm (correspondant à des agglomérats denses). Les particules de taille supérieure à 1 µm étaient rares.

Note. Une distribution log-normale est telle que les logarithmes des tailles des particules présentent une distribution normale (c'est-à-dire selon la loi de répartition de Gauss).

Selon Taddei et coll. (1979), les poussières émises par un four de production de ferro-silicium étaient à 80 % de tailles inférieures à 1 µm, de forme sphérique, et amorphes à plus de 90 %, avec moins de 4 % de silice cristalline.

Aïtcin et coll. (1984) soulignent qu'il n'existe pas qu'un type de fumée de silice condensée, et que composition chimique, cristallinité et granulométrie peuvent varier largement, alors que les publications précisent rarement quel matériau elles étudient. Les propriétés, dont un extrait est présenté dans le tableau 5.IX, peuvent encore varier en fonction des périodes de fabrication, du procédé (par exemple avec ou sans récupération de chaleur), ou du degré de compaction.

Cunningham et coll. (1996) ont étudié les répartitions granulométriques des particules émises par un four fabriquant essentiellement un silico-aluminium. Un total de 6 357 particules primaires et 85 agrégats (correspondant à 10 236 particules primaires) a été examiné au moyen d'un microscope électronique à transmission. Les particules primaires ont des diamètres compris entre 34 et 50 nm, et les agrégats entre 124 et 180 nm. Globalement, l'aérosol est bien un aérosol ultra-fin.

Type de métal ou d'alliage	BET m ² /g	DM (μm)	SiO ₂	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	C	MnO
Si	18,5	0,18	94	0,03	0,06	0,5	1,1	0,04	0,05	1	-
Fe-Si 75 %	15	0,26	89	0,6	0,4	0,2	1,7	0,2	1,2	1,4	0,06
Fe-Si 50 %	13,5	0,21	83	2,5	2,5	0,8	3,0	0,3	2,0	1,8	0,2
FeCrSi	14,5	0,18	83	1	2,5	0,8	7,0	1,0	1,8	1,6	0,2
CaSi		-	53,7	0,7	0,9	23,2	3,3	0,6	2,4	3,4	-
SiMn		-	25	1,8	2,5	4,0	2,7	2,0	8,8	2,5	36,0

Tableau 5.IX. Quelques caractéristiques physicochimiques de fumées de silice condensées selon le type de l'alliage fabriqué, et pourcentages en quelques éléments exprimés en oxydes. BET : surface spécifique ; DM : diamètre moyen. (D'après Aïtcin et coll., 1984.)

Étudiant les concentrations de poussières au voisinage de fours à ferro-silicium, Prochazka (1971) en souligne la très forte variabilité, et recommande des échantillonnages de longue durée (au moins 8 heures), répartis sur plusieurs postes de travail et tout au long de l'année, pour mieux connaître l'exposition moyenne vraie. Il trouve des concentrations allant de 1 à 12 mg.m⁻³ environ (fraction alvéolaire), et de 2 à 26 mg.m⁻³ environ (fraction inhalable). Comme d'autres, il observe de faibles pourcentages de silice cristalline (de < 1 % à 4 % ; une valeur à 21 %, non commentée) dans une matrice à forte teneur en silice amorphe.

3.3. Propriétés toxicologiques expérimentales des silices amorphes

3.3.1. Toxicité *in vitro*

Pour Klosterkötter et Robock (1975), le mécanisme d'action toxique des silices amorphes est physico-chimique. Il commence par un transfert d'électrons, mis en évidence par une chimiluminescence apparaissant quelques secondes après l'addition de particules de silice à une culture de macrophages alvéolaires, et durant une dizaine de minutes. La chimiluminescence semble liée à la toxicité des silices testées ; elle n'est pas observée avec des poussières inertes (nature non précisée).

Note. La chimiluminescence est une émission lumineuse, mise en évidence le plus souvent avec une molécule (le luminol), très sensible à la présence d'eau oxygénée dont

la formation accompagne le stress oxydant (excès d'espèces activées de l'oxygène, néfaste à la cellule).

Par ailleurs, des élévations locales de température, par exemple lors d'opérations de découpe ou par friction, peuvent inactiver la silice ; corrélativement, on observe par luminescence induite aux rayons X une modification des spectres énergétiques des électrons en fonction de la température de recuit, alors que, par infrarouge, aucune modification du contenu en quartz n'est apparente.

Pandurangi et coll. (1990) ont trouvé, pour du quartz (Min-U-Sil, surface spécifique 5 m²/g) et de la silice pyrogénée (Cab-O-Sil, 200 m²/g), une corrélation entre l'intensité de la bande d'absorption infrarouge des groupements silanol (SiOH) libres (non impliqués dans une liaison hydrogène) et le pouvoir hémolytique des particules. Le chauffage des deux silices entraîne, jusqu'à 500 °C, une augmentation des fonctions silanol libres, par désorption de molécules d'eau, et une augmentation de leur pouvoir hémolytique. Au-delà de 500 °C, les fonctions silanol libres diminuent rapidement (par réaction avec des silanols voisins et formation de siloxanes, selon la réaction $\text{Si-OH} + \text{Si-OH} \rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O}$) ; parallèlement, le pouvoir hémolytique diminue. Le chauffage à 1 100 °C entraîne la disparition des fonctions silanol libres ; l'activité hémolytique devient très faible. Enfin, la réadsorption progressive de molécules d'eau à la surface (très lente après chauffage à 1 100°C) entraîne la restauration du pouvoir hémolytique. À masse égale, la silice amorphe présente un pouvoir hémolytique supérieur à celui de la silice cristalline ; en revanche, à surface égale, ce pouvoir est plus faible.

Kuhn et Demers (1992) ont étudié la production d'eicosanoïdes (voir le glossaire ; ils interviennent dans la contraction des muscles bronchiques, l'inflammation et la fibrose) par des macrophages alvéolaires (MA) de rats en présence de particules de charbon bitumineux, de quartz (Min-U-Sil) ou de silice pyrogénée (Cab-O-Sil), après différents traitements thermiques. Les silices amorphe et cristalline, non traitées ou calcinées à 500 °C, entraînent une augmentation significative de la production de prostaglandine E2 (PGE2), de thromboxane A2 (TXA2) et de leukotriène B4 (LTB4, que ces mêmes auteurs ont par la suite [1995] supposé l'eicosanoïde le plus important dans les effets pulmonaires à long terme de la silice). Après calcination à 1 100 °C (qui fait disparaître, comme le rappelle l'article précédent, les groupements silanol), on ne constate plus d'augmentation significative des niveaux de ces eicosanoïdes. Ces résultats confirment l'importance des fonctions silanols dans la cytotoxicité des silices amorphes et cristallines.

Warshawsky et coll. (1994) ont étudié la cytotoxicité à 24 et 48 heures de particules de quartz (surface spécifique : 4 m²/g), de silice pyrogénée (200 m²/g), de silice précipitée (120 m²/g), de gel de silice (250 m²/g), d'alumine (200 m²/g) ou d'oxyde ferrique (11 m²/g) pour des macrophages alvéolaires de rats Sprague-Dawley et de hamsters syriens dorés. Les diamètres moyens en nombre s'étendaient de 0,27 µm à 0,38 µm, sauf pour la silice cristalline (0,83 µm). Les concentrations testées allaient de 0,01 à 0,5 mg/l

pour $1,8 \cdot 10^6$ macrophages. La silice pyrogénée contenait 1,6 % de silice cristalline (aucune précision n'est ajoutée sur ce point).

La viabilité des MA de hamster à 24 h diminuait à 27 % à 0,05 mg/l, et devenait nulle à 0,1 mg/l pour le gel de silice. Pour ces mêmes concentrations, les viabilités mesurées décroissaient à 76 et 67 % (silice cristalline), 51 et 42 % (silices précipitée et pyrogénée) ; elles devenaient nulles à 0,5 mg/l. L'oxyde ferrique et l'alumine ne provoquaient pas de modification notable de la viabilité des MA chez le hamster. Les résultats étaient analogues pour les MA murins.

Les données montrent que les silices pyrogénée ou précipitée sont, à doses comparables, aussi cytotoxiques pour les MA de rats et de hamsters que le quartz ; le gel de silice est plus fortement cytotoxique. Les particules d'alumine et d'oxyde ferrique ne montrent pas de cytotoxicité significative. Pour les auteurs, ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse de l'importance des silanols de surface dans la toxicité ; le gel de silice, qui possède la plus grande surface spécifique, présente la plus forte cytotoxicité. La silice pyrogénée, dont la surface spécifique est plus grande que celle de la silice précipitée mais a moins de silanols par unité de surface, montre une cytotoxicité similaire à celle de la silice précipitée.

Le rôle des fonctions silanol superficielles est encore évoqué par Mao et coll. (1995 ; action du PVNO), Élias et coll. (2000) et Fubini et coll. (2004). Le recouvrement de ces sites par des ions aluminium (et éventuellement fer) modifie les propriétés de surface de la particule, ce qui fait que certains quartz peuvent en réalité présenter une activité biologique très réduite.

Wottrich et coll. (2004) ont étudié les effets biologiques de particules ultra-fines d'hématite (diamètre moyen 70 nm), de deux silices colloïdales (diamètre moyen 60 nm), et de particules de quartz (taille $< 5 \mu\text{m}$), sur des mono- et co-cultures de cellules épithéliales humaines (A549) et de macrophages (THP-1, Mono Mac 6). Ils ont montré par microscopie électronique à transmission que des particules d'hématite sont internalisées par les trois types de cellules, ce qu'ils n'ont pu établir pour les particules de silices colloïdales, en raison de leur trop faible densité ou, peut-être, de leur dissolution. La cytotoxicité des particules a été déterminée à 24 h pour des concentrations entre 10 et 200 $\mu\text{g/ml}$ par dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). La silice colloïdale la plus fine s'est montrée la plus cytotoxique à même concentration massique. Les macrophages THP1 étaient très sensibles aux particules, notamment de quartz, mais aussi d'hématite. Les macrophages Mono Mac 6 étaient peu sensibles à tous ces types de particules. Pour toutes les particules testées, les cellules épithéliales sécrétaient les cytokines IL-6 et IL-8 de façon dose-dépendante ; les concentrations mesurées pour les silices colloïdales étaient intermédiaires entre celles, très élevées, induites par le quartz et celles, faibles, dues à l'hématite. Les co-cultures de cellules épithéliales et de macrophages THP-1 ou Mono Mac 6 montraient une très forte augmentation de la libération de cytokines en présence de particules par rapport aux mono-cultures.

Chen et von Mikecz (2005) confirment la pénétration de nanoparticules de silice (50 à 200 nm) dans divers types de cellules, jusqu'au noyau où sont formés des agglomérats protéiques aberrants qui rappellent entre autres des effets systémiques auto-immuns.

| Synthèse

Les études *in vitro* permettent d'obtenir rapidement des indications relatives à la toxicité cellulaire et aux mécanismes possibles. Ici, les études montrent l'importance de la chimie de surface (voir Élias et coll., 2000) et en particulier des fonctions silanol et siloxane présentes à la surface des silices amorphes ou cristallines. Il est constaté une augmentation de la cytotoxicité, pour une même dose massique, lorsque la taille des particules de silice amorphe diminue. Les silices amorphes montrent généralement une cytotoxicité plus importante que celle d'autres poussières minérales comme l'alumine ou l'oxyde ferrique.

3.3.2. Toxicité *in vivo* chez l'animal

Les études sur les effets des silices amorphes ont été revues par Warheit (2001) et Merget et coll. (2002). Ces publications concluent que les effets pulmonaires des silices amorphes sont moins importants et plus réversibles que ceux provoqués par la silice cristalline. Selon ces auteurs, l'exposition à la silice amorphe chez l'animal n'entraîne pas la formation de nodules silicotiques persistants, même à des niveaux d'exposition plus importants que ceux susceptibles d'être rencontrés lors d'expositions professionnelles. Pour Merget et coll., la formation de collagène est au moins partiellement réversible après arrêt de l'exposition ; inflammation et emphysème pulmonaires ont été rapportés par nombre d'études. Pour Warheit et coll., il semble clair que certains types de silice amorphe produisent des effets pulmonaires plus importants que d'autres ; il existe cependant un manque notable d'études toxicologiques comparatives sur les différentes silices amorphes.

| Silice pyrogénée

Schepers et coll. (1957a, b) ont publié une série de résultats d'expérimentations au schéma passablement complexe, exposant par inhalation notamment des rats (30 mâles et 30 femelles Wistar albinos) et des cobayes (50) à une silice amorphe pyrogénée (97,64 % de silice amorphe par rayons X) ; la taille moyenne des particules était d'environ 20 nm, la surface spécifique 169 m²/g, et le pH en suspension aqueuse, de 4,3. L'exposition, mesurée chaque semaine par échantillonnage sur filtre, était en moyenne de 1,5 mg/cu.ft (soit environ 53 mg/m³) ; le diamètre de coupure (diamètre

aérodynamique pour lequel la probabilité de capture des particules est de 50 %) de l'aérosol était d'environ 3,5 µm.

Expérimentation avec les rats (Schepers et coll., 1957a)

Vingt rats ont été soustraits à l'exposition après 6 mois, et leur évolution suivie régulièrement : 7 sont morts, dont 4 d'une affection que les auteurs estiment non liée à l'exposition ; les autres ont été sacrifiés à intervalles réguliers et examinés.

Dès trois mois d'exposition, on observe de nombreux foyers inflammatoires répartis sur les deux poumons, eux-mêmes fortement congestionnés. Les ganglions lymphatiques trachéobronchiques montrent une hyperplasie du tissu lymphoïde, sans nécrose ni fibrose, sinon tardive par rapport à celle du tissu pulmonaire. À partir du 4^e mois commence un emphysème dont la gravité s'accroît avec l'exposition.

Des nodules pulmonaires sont observés, composés de deux types de cellules. Au centre, un amas de cellules macrophagiques mal différenciées et chromophobes. À la périphérie, une accumulation préférentielle de cellules plasmatiques bien différenciées et dont les noyaux se colorent en sombre. Beaucoup de nodules sont enveloppés d'une couche de cellules épithéliales. De petits faisceaux de collagène peuvent être mis en évidence dès les premiers stades.

Chez les rats soustraits à l'exposition, un retour progressif à la normale du tissu pulmonaire, bien que se ralentissant dans le temps, se manifestait : l'emphysème régressait et le pourcentage de silice en masse de poumon sec diminuait rapidement. Six mois après la fin de l'exposition, l'emphysème avait presque disparu, les ganglions lymphatiques n'étaient plus que légèrement hypertrophiés, les pigmentations focales réduites. Après un an sans exposition, les poumons restaient légèrement distendus, mais les réactions focales avaient pratiquement disparu ; il ne restait qu'une tendance à l'atélectasie focale (affaissement des alvéoles) et à la congestion pulmonaire. Le tissu lymphoïde était revenu à la normale, sauf là où la fibrose était apparue.

On remarquera la convergence globale de ces observations avec celles de Policard et Collet (1954) relatives à une silice à l'arc.

Expérimentation avec les cobayes (Schepers et coll., 1957b)

L'étude sur des cobayes albinos (Schepers et coll., 1957b) a été organisée de façon similaire et dans les mêmes conditions, essentiellement avec deux groupes d'animaux exposés pendant un ou deux ans, et leur suivi pendant l'exposition et après cessation de l'exposition. La mortalité observée était nettement inférieure à celle chez le rat (sur 50 animaux, 2 morts seulement, non liées à l'exposition), et la pathologie pulmonaire moins étendue et d'apparition moins rapide, en particulier par la quasi-absence d'hyperplasie du tissu lymphoïde, la présence plutôt de collagène que de réticulum

(contrairement au rat), un emphysème moins marqué, et des ganglions lymphatiques moins chargés. L'élimination de la silice déposée dans les poumons était également très rapide après cessation de l'exposition (30 % sont éliminés en deux semaines après un an d'exposition).

Murphy et coll. (1998) ont comparé les effets chez des rats Sprague-Dawley mâles de l'instillation intratrachéale de 1 mg des différentes particules suivantes :

- silice cristalline (quartz DQ12 lavé à l'acide chlorhydrique ; 61 % de taille > 300 nm) ;
- silice pyrogénée (Cab-O-Sil) ;
- noir de carbone (M120, taille des particules primaires 50 nm) ;
- particules diesels (taille primaire 20 nm, présence de métaux, notamment fer et aluminium).

Il y avait six animaux par groupe de contrôle et d'exposition pour chaque type de particule et pour les autopsies, après des périodes d'exposition de 48 h, 1, 3, 6 ou 12 semaines, pour un total de 150 animaux.

L'objectif principal était de comparer les particules diesels aux autres. La silice amorphe a été choisie parce qu'elle est constituée de particules primaires ultra-fines (7 nm) aux caractéristiques d'aggrégation proches des particules diesels.

La perméabilité pulmonaire, l'inflammation, la concentration de surfactant, l'activité de la phosphatase alcaline et de la gamma glutamyl transpeptidase (GGT) ont été évaluées dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) entre 48 heures et 12 semaines après l'instillation.

La silice amorphe entraînait une augmentation immédiate de la perméabilité pulmonaire, démontrée par une rapide augmentation de la masse relative des poumons et des protéines acellulaires du LLBA. L'accroissement à 48 heures du nombre des neutrophiles suggérait une réponse inflammatoire précoce. L'augmentation de l'activité de la GGT et de la phosphatase alcaline dans le LLBA montrait une atteinte des cellules épithéliales. Ces effets avaient apparemment disparu au bout des 12 semaines. Entre 6 et 12 semaines, seule subsistait une inflammation moyenne, attestée par une présence accrue de macrophages.

Le quartz entraînait une augmentation durable de la perméabilité pulmonaire et des protéines acellulaires du LLBA. Une augmentation progressive de l'inflammation, attestée par une forte augmentation du recrutement cellulaire et une forte proportion de neutrophiles dans le LLBA, est également notée.

Les particules diesels et le noir de carbone ont montré une action biologique beaucoup plus faible que les silices testées. Les auteurs pensent que la cristallinité peut avoir plus d'importance pour la toxicité pulmonaire à long terme que la taille ou la surface totale

de la particule. Pour les effets à court terme, objet de l'étude, la réactivité de surface est plus importante que la taille de la particule.

Johnston et coll. (2000) ont étudié sur des rats Fisher 344 mâles les effets pulmonaires d'une exposition subchronique par inhalation à de la cristobalite (3 mg/m^3 ; diamètre aérodynamique médian en masse $1,3 \mu\text{m}$) ou à de la silice pyrogénée (Aérosil 200, 50 mg/m^3 ; taille moyenne des particules primaires 12 nm , diamètre aérodynamique médian en masse $0,81 \mu\text{m}$, surface BET $200 \text{ m}^2/\text{g}$). Les concentrations ont été définies dans le but d'atteindre, pour les deux types de silice, des concentrations intra-alvéolaires en neutrophiles similaires, et de déterminer s'il existait une relation entre une inflammation prolongée et la fréquence de mutation du gène HPRT des cellules alvéolaires épithéliales. Les observations ont été conduites après des expositions de 6,5 ou 13 semaines, et après des durées sans exposition de 3 ou 8 mois.

Après 13 semaines d'exposition, les neutrophiles étaient passés de 0,26 % (témoins) à 47 % (silice cristalline) ou 55 % (silice amorphe ; la différence en nombre de neutrophiles est significative entre ces deux types de silice) du total des cellules récupérées par lavage broncho-alvéolaire. Les niveaux de lactate déshydrogénase étaient doublés pour la silice amorphe par rapport à ceux pour la silice cristalline. Au cours des 8 mois suivants, tous les paramètres suivis continuaient à croître pour la silice cristalline, et décroissaient rapidement pour la silice amorphe, pour laquelle ils étaient revenus à la normale à la fin de cette période. L'augmentation de la fréquence de mutation du gène HPRT n'a été observée après 13 semaines d'exposition que pour la silice cristalline, ce qui semblait indiquer, selon les auteurs, que, en plus de la persistance de la réponse inflammatoire, la biopersistance, la solubilité et une toxicité directe ou indirecte envers les cellules épithéliales pourraient être des facteurs clés pour l'induction de mutations ou pour la mort cellulaire.

Ernst et coll. (2002) ont étudié, sur des rats Wistar WU (433 femelles), l'inflammation pulmonaire et la fibrose provoquées par des instillations intratrachéales, selon divers protocoles, de silice pyrogénée (Aérosil 150), silice cristalline (quartz DQ12), noir de carbone ultra-fin ou poussières de charbon, ainsi que l'influence de l'injection sous-cutanée de poly-2-vinylpyridine-*N*-oxyde (PVNO ; il a été montré dans les années 1960-70 que ce polymère inhibe la progression de la fibrose provoquée par le quartz et en améliore la clairance pulmonaire). La taille moyenne des particules primaires de silice pyrogénée était de 14 nm et sa surface spécifique (BET) de $150 \text{ m}^2/\text{g}$. Préalablement à l'étude, la vitesse d'élimination de la silice amorphe du poumon a été déterminée : 82 % de la silice amorphe était encore dans le poumon six heures après une instillation intratrachéale de 2 mg , et 18 % après 2 jours ; l'élimination se poursuivait avec une demi-vie de 11 jours. Des élévations de 2,5 à 7,7 fois des niveaux de lactate déshydrogénase (LDH), protéines totales, phosphatase alcaline et gamma-glutamyl transférase ont été constatées dans le LLBA par rapport aux témoins. Sans injection de PVNO, le quartz provoquait un accroissement de 24 fois de la LDH et de 13 fois des protéines totales. Le

PVNO réduisait nettement l'incidence et la sévérité de nombre de modifications pulmonaires ou ganglionnaires, y compris pour les deux types de silice ; des effets similaires sont connus pour le quartz (Knaapen et coll., 2002 ; Schins et coll., 2002 ; Albrecht et coll., 2004).

La silice amorphe était considérée comme faiblement biopersistante, mais de toxicité pulmonaire aiguë supérieure à celle du quartz. L'inflammation qu'elle provoquait était caractérisée par une absence de lipoprotéines alvéolaires et un afflux limité de macrophages intra-alvéolaires, qui restaient majoritairement viables. Elle induisait également une fibrose interstitielle prononcée, mais très localisée. Les lésions semblaient résulter de dommages épithéliaux dans les zones de dépôt, avec inflammation et formations granulomateuses.

Morfeld et coll. (2006) ont étudié sur des rats Wistar (848 femelles) la prévalence de tumeurs pulmonaires après instillation intratrachéale de particules peu solubles et faiblement toxiques (noir de carbone de grande et faible surface spécifique, dioxydes de titane de grande et faible surface spécifique et de particules diesels de faibles surfaces spécifiques), ainsi que de particules de silice pyrogénée de grande surface spécifique, considérées comme solubles. Un groupe témoin non exposé a également été utilisé. Les masses instillées variaient entre 3 et 120 mg. Les poumons des rats morts ou sacrifiés après 125 à 129 semaines ont été étudiés. Les résultats montrent que les particules de grandes surfaces spécifiques induisent plus de tumeurs que celles de faibles surfaces spécifiques, et sont compatibles avec l'existence d'un seuil de l'ordre de 10 mg pour l'induction de tumeurs pulmonaires. La prévalence des tumeurs pulmonaires est beaucoup plus faible pour les rats instillés avec la silice amorphe qu'avec les autres particules insolubles.

| Silice précipitée

Schepers (1981) a également étudié la toxicité par inhalation d'une silice précipitée (Hi-Sil 233, taille des particules primaires 22 à 35 nm, taille moyenne des agglomérats 2 µm, teneur en eau 12 à 15 %, pH 7,1, solubilité dans l'eau 1,49 mg/l), notamment sur des rats Wistar albinos (au total 134, durée d'exposition 15 mois) et des cobayes (au total 293, durée d'exposition 24 mois). La concentration atmosphérique moyenne était de 126 mg/m³. Pour les deux espèces, les poids des poumons doublient vers la fin de l'exposition par rapport à ceux des témoins, mais revenaient rapidement à la normale après arrêt de l'exposition. La réponse pulmonaire est limitée à une phagocytose et à la formation d'amas cellulaires localisés, qui se résorbent progressivement après arrêt de l'exposition. D'après ces observations et par comparaison avec 24 autres variétés de silices étudiées de manière comparable, Schepers considère que la silice précipitée amorphe submicronique est la moins active de toutes les silices sur le plan biologique.

Reuzel et coll. (1991) ont exposé par inhalation des groupes de rats Wistar (70 mâles et 70 femelles par groupe) à trois types de silice amorphe :

- Aérosil 200 (silice pyrogénée ; 1, 6 ou 30 mg/m³), décrite comme hydrophile et engendrant facilement des poussières. Surface spécifique 200 m²/g, taille moyenne des particules primaires 12 nm (sphériques), acide (pH env. 4), SiO₂ > 99,8 %, chlorures < 250 ppm ;
- Aérosil R974 (30 mg/m³), obtenue à partir de la précédente par traitement chimique (environ 1 % de carbone total), hydrophobe. Surface spécifique 170 m²/g ;
- et Sipernat 22S (silice précipitée, 30 mg/m³), choisie en raison de sa surface spécifique égale à celle de l'Aérosil 200. Taille moyenne des particules sphériques 18 nm, pH 6,3, SiO₂ 98 %, sulfate de sodium 0,3 % ;

ou à du quartz (60 mg/m³), pendant 6 heures par jour, 5 jours par semaine, et pendant 13 semaines. Treize, 26, 39 ou 52 semaines après la fin de l'exposition, 20, 10, 10 et 20 rats de chaque sexe ont été respectivement sacrifiés dans chaque groupe pour des examens anatomopathologiques.

À la fin de l'exposition, les poids relatifs et absolus des poumons étaient augmentés de façon statistiquement significative dans tous les groupes, sauf pour celui exposé à 1 mg/m³ d'Aérosil 200. Cet accroissement était plus marqué pour les mâles que pour les femelles, et fortement réduit ou annulé après 13 semaines sans exposition, sauf pour l'Aérosil 200 (pour laquelle le poids pulmonaire avait tendance à rester supérieur jusqu'à la semaine 26) et pour le quartz. Pour ce dernier, le poids pulmonaire croissait régulièrement après la fin de l'exposition, jusqu'à atteindre ou dépasser trois fois celui des contrôles.

Les observations étaient similaires pour le taux de collagène, mais les niveaux ne revenaient à la normale que pour l'Aérosil 200 (1 mg/m³) et le Sipernat 22S, et cela une année après la fin de l'exposition. Dans le cas du quartz, le contenu en collagène n'était que légèrement supérieur à la normale à la fin de l'exposition, mais continuait à croître notablement par la suite.

Les observations histologiques à la fin des expositions montraient chez tous les rats exposés l'accumulation de macrophages alvéolaires, de débris cellulaires et de leucocytes polymorphonucléés dans les lumières alvéolaires, un accroissement du nombre des pneumocytes de type II et des macrophages sur les parois alvéolaires. Les changements étaient les plus accusés pour l'Aérosil 200 et le quartz. La tendance à la récupération était générale, sauf pour le quartz, seul à induire des granulomes pulmonaires persistants ressemblant à des nodules silicotiques. Une année après la fin de l'exposition, une métaplasie focale a été observée chez un rat mâle et un carcinome épidermoïde du parenchyme chez un rat femelle.

Après le quartz, c'est l'Aérosil 200 qui provoquait les atteintes pulmonaires les plus marquées, bien qu'il ait été le plus rapidement éliminé. Le Sipernat 22S ne provoquait qu'une faible réponse macrophagique, bien qu'encore présent dans les poumons 26 semaines après la fin de l'exposition. L'Aérosil R974, dérivé de l'Aérosil 200 par traitement chimique, occupait une situation intermédiaire, bien que provoquant des lésions granulomateuses, ces dernières régressant puis disparaissant par la suite.

| Silices colloïdales

Dans une étude rapportée par Lee et Kelly (1992 ; 1993), 4 groupes de 25 rats chacun ont été exposés à des concentrations de silice amorphe (Ludox [marque de la société DuPont], suspension colloïdale, diamètre des particules environ 22 nm) de 0, 10, 50 ou 150 mg/m³ (en SiO₂ sec), 6 heures par jour, 5 jours par semaine, pendant 4 semaines. Après la fin de l'exposition (jour 0), 5 rats ont été sacrifiés, puis 10 (jour 10), et enfin 10 (3 mois). La silice présentait une demi-vie pulmonaire d'environ 50 jours.

À 10 mg/m³, aucun effet n'a été observé. Après exposition à 50 ou 150 mg/m³, les modifications pulmonaires (macrophages chargés de silice dans les bronches, infiltrations par les neutrophiles, hyperplasie des pneumocytes de type II) étaient dose-dépendantes. La plupart des paramètres biochimiques revenaient à la normale après trois mois de récupération, mais il subsistait de minuscules lésions nodulaires dans les bronches et régions périvasculaires. Les ganglions lymphatiques trachéaux et médiastinaux étaient hypertrophiés (hyperplasie tissulaire, macrophages chargés de particules). De nombreuses particules libérées par des macrophages nécrosés ont été phagocytées par des histiocytes, menant à la formation de granulomes.

Cette étude a été complétée par Warheit et coll. (1990, 1991) sur des groupes de rats mâles Crl:CD BR exposés deux ou quatre semaines aux mêmes concentrations, pour déterminer divers paramètres du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA). Un groupe exposé quatre semaines a été conservé pour examens après une récupération de trois mois. D'autres animaux ont servi à évaluer le taux de renouvellement cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) ou encore les dépôts pulmonaires.

L'exposition au Ludox à 150 mg/m³ pour deux ou quatre semaines, ou à 50 mg/m³ pour quatre semaines, provoquait une inflammation pulmonaire, une augmentation des concentrations de protéines totales, lactate déshydrogénase et phosphatase alcaline dans le LLBA, ainsi qu'une phagocytose réduite par les macrophages. L'incorporation de thymidine tritiée était augmentée dans les cellules des bronchioles terminales et les cellules parenchymales dans les groupes exposés à 50 ou 150 mg/m³, avec retour à la normale après trois mois sans exposition. L'exposition à 10 mg/m³ était confirmée comme sans effet.

Warheit et coll. (1995) ont comparé les effets chez le rat CD de deux types de silice cristalline (quartz et cristobalite), d'une silice amorphe (Zeofree 80, mode de fabrication et caractéristiques non précisés) et d'une silice colloïdale (Ludox). Les conditions d'exposition n'étaient pas identiques pour les différentes silices (tableau 5.X).

Type de silice	Concentration (mg/m ³)	Durée d'exposition	Nombre de rats
Cristobalite	10 ou 100	3 jours	48
Silice amorphe	10 ou 100	3 jours	48
Quartz	100	6 h/j pendant 3 jours	24
Silice colloïdale	10, 50 ou 150	6 h/j, 5 j/semaine, pendant 2 ou 4 semaines	Non précisé

Tableau 5.X. Conditions d'exposition mises en œuvre par Warheit et coll. (1995).

Le recrutement cellulaire, la lactate déshydrogénase (LDH), les protéines totales et la N-acétyl-glucosaminidase (NAG) ont été évalués à différents moments dans le LLBA.

Les expositions aux deux formes de silice cristalline entraînaient une inflammation pulmonaire persistante caractérisée par la présence de neutrophiles et une importante augmentation des marqueurs LDH et NAG dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire. L'exposition aux deux formes de silice amorphe n'entraînait qu'une inflammation transitoire caractérisée par un retour à la normale au bout de 3 mois des principaux paramètres biochimiques.

| Autres types de silice amorphe

Klosterkötter (1966) a étudié le pouvoir silicogène d'une silice amorphe (préparée par réduction de quartz à l'arc électrique à plus de 2 500 °C en présence de charbon, suivie d'une oxydation naturelle à l'air ; surface spécifique BET 20 m²/g), qu'il désigne par LK20 (Lichtbogen-Kieselsäure). La taille des particules allait de 20 à 300 nm. La silice était fortement hydrophobe par suite d'un traitement chimique avec des chlorosilanes (pourcentage de carbone total : environ 1 %). Elle recelait notamment des traces d'aluminium (0,2 à 0,32 % en Al₂O₃) et de fer (0,02 à 0,05 % en Fe₂O₃).

L'étude a été menée sur deux groupes de 200 rats albinos femelles exposés pendant un an, 5 heures par jour, 5 jours par semaine, à une concentration très importante, de l'ordre de 152 mg/m³.

Après 3 mois, les poumons des rattes contenaient 13,43 mg de silice (et les ganglions médiastinaux 0,78 mg), après 5 mois 16,52 mg, et après un an, 46,15 mg (et les

ganglions médiastinaux, 6,76 mg). À l'examen microscopique à 3 mois, des phagocytes remplis de poussières réfringentes étaient observés. Dans les espaces périvasculaires et péribronchiolaires étaient observés des amas cellulaires, accompagnés de quelques fibroblastes, et parfois un foyer nécrotique et un début de fibrose. Les ganglions lymphatiques médiastinaux, hypertrophiés, révélaient des réticulo-histiocytes remplis de particules, comme on peut en observer après inhalation de quartz.

Après une année d'exposition, les amas cellulaires s'étaient développés ; certains avaient fusionné. La fibrose avait nettement progressé, approchant parfois le stade IV. Après une période sans exposition, l'élimination des particules continuait (environ -59 % après 6 mois). Bien que relativement bien éliminée (-69 % de poussières alvéolaires après 3 mois sans exposition, selon un essai spécifique), cette silice est plus retenue que d'autres silices amorphes (-92 % après 3 mois sans exposition pour l'Aérosil R972 hydrophobe ; -85 % pour la silice trempée D500 ; pour le quartz : -28 %). Les modifications de type silicotique n'ont pas régressé.

Pour l'auteur, cette silice LK20 hydrophobe présentait indubitablement un effet silico-gène, même s'il est moindre et moins rapidement apparent que pour le quartz.

En 1992, Rosenbruch a étudié l'évolution des ganglions lymphatiques associés aux poumons, chez le rat Han:Wistar mâle exposé par inhalation, 7 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 12 mois, soit à la silice amorphe (verre de quartz), soit à la silice cristalline DQ12. Les animaux ont été sacrifiés aux mois 4, 8 et 12, ainsi qu'après une période de récupération de 12 mois. La silice amorphe induisait de sévères fibroses, bien qu'avec une certaine latence. Après les 12 mois d'exposition, comme après les 12 mois de récupération, les modifications morphométriques des ganglions tendaient à être supérieures (l'auteur indique « *nearly significantly increased, as compared with DQ-12* », mais ne fournit aucun calcul de probabilité) à celles observées pour la silice cristalline : les aires de réaction typiques du quartz (QTA) et leur rapport à la surface totale du ganglion (LNA) s'élevaient à 0,119 mm² et 55,9 % à 24 mois, contre 0,035 mm² et 40 % pour le quartz. Cependant, à 4 mois, c'est le rapport QTA/LNA pour le quartz qui était accru de façon statistiquement significative ($p = 0,004$) par rapport à celui pour la silice amorphe.

Au niveau pulmonaire, c'est l'inverse qui était observé : de légères réactions focales avec la silice amorphe, et une fibrose marquée avec la silice cristalline.

| Synthèse

Les études chez l'animal montrent que l'inhalation de silices amorphes ultra-fines entraîne une inflammation des poumons rapide et importante, mais peu durable si l'exposition cesse. Au contraire, les silices cristallines entraînent une inflammation d'apparition plus progressive mais persistant même après arrêt de l'exposition. Les

lésions provoquées par les silices amorphes sont très localisées et au moins partiellement réversibles. Bien que peu biopersistantes – probablement en raison de leur relative solubilité (Borm et coll., 2006) – les silices amorphes sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques et dans des macrophages.

Dans le cas de silices amorphes obtenues par oxydation de silicium, qui ne sont pas constituées majoritairement de PUF, et pour lesquelles plusieurs auteurs ont signalé un taux de silice cristalline de l'ordre du pourcent (Princi et coll., 1962 ; Perdrix et coll., 1984), il a été constaté un effet silicogène important et non réversible chez le rat.

3.4. Données toxicologiques rapportées chez l'homme

Des articles de revue relatifs à la cancérogénicité potentielle des silices amorphes ont été publiés par Lewinson et coll. en 1994, McLaughlin et coll. en 1997, et par le CIRC en 1997. Beaucoup d'études sur les cancers bronchopulmonaires concernent des expositions à des diatomites ; il n'est pas possible d'y séparer les effets des différents types de silices (amorphes et cristallines). Le CIRC conclut que l'on ne peut classer les silices amorphes du point de vue de leur cancérogénicité.

Merget et coll. (2001) ont effectué une revue des effets des silices amorphes chez l'homme et chez l'animal. Ils concluent qu'aucune étude n'établit une relation entre l'exposition à une silice amorphe synthétique et la survenue d'une fibrose pulmonaire. En effet, pour les quelques études apparemment positives, il y a eu exposition conjointe à la silice cristalline. Peu d'études se sont intéressées à l'influence de la silice amorphe sur les bronchites chroniques et les bronchopneumopathies chroniques obstructives, et elles n'ont pas montré de lien évident.

3.4.1. Silices pyrogénées

Volk (1960) a effectué pendant 12 années un suivi des radiographies pulmonaires chez 215 ouvriers employés à la fabrication de silices pyrogénées (Aérosil). La silice (amorphe, comme vérifié par diffraction X) représentait plus de 99,8 % du produit, et la taille des particules primaires allait de 5 à 40 nm (agglomérats de 5 à 50 µm). La concentration atmosphérique massique dans l'atelier de production était estimée entre 3 et 7 mg/m³, et l'inhalation quotidienne à environ 120 mg par jour. Un total de 720 radiographies a été examiné. La seule observation significative, selon les auteurs, consistait en l'accentuation du tracé des fissures interlobaires, faisant penser à une légère pleurite. Dans le seul cas où l'on a pu surveiller son évolution, elle a disparu en quelques semaines.

Un cas isolé, rapporté en quelques lignes par Vaillant et coll. (1983), concerne une pharmacienne de 23 ans, sans antécédent pathologique, révélant « un syndrome interstitiel à type d'opacités micronodulaires diffuses réparties sur les 2 champs ». La biopsie « montre une fibrose interstitielle débutante, une hyperplasie lymphoïde et, en lumière polarisée, de très nombreux macrophages chargés de poussières biréfringentes, identifiées, après incinération, à de la silice amorphe ». Cette jeune femme a préparé pendant sept mois des lavements dont l'homogénéisant était l'Aérosil. L'identification des particules prélevées dans les poumons à de la silice amorphe pose question, celle-ci devant apparaître comme non biréfringente ; aucune précision ni commentaire ne sont apportés sur ce point. McDonald et Roggli ont signalé en 1995 que l'utilisation de la lumière polarisée pour identifier le type de particule peut être délicate.

3.4.2. Silices précipitées

Plunkett et deWitt (1962) ont étudié les radiographies de 78 travailleurs (âge moyen 34,5 ans) exposés (de 1 an à 16,8 ans, moyenne 4,8 ans) à des silices amorphes fabriquées par précipitation de silicates de sodium (« Hi-Sil ») ou de calcium (« Silene EF »). La concentration moyenne des poussières dans l'air de l'usine était élevée (médiane $7,4 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ dans l'atmosphère ambiante) ; la concentration maximale a été mesurée au niveau de l'ensachage ($204 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$), sans autre précision (exposition personnelle ou non, durée d'échantillonnage). Trente et une de ces personnes étaient exposées entre 50 et 90 % de leur temps de travail, 7 moins de 30 %, et les 40 autres 100 %. Des radiographies annuelles ont été prises dans ce groupe pendant toute la période d'exposition ; aucune évolution n'a été mise en évidence.

En 1979, Wilson et coll. ont recherché les effets éventuels de l'inhalation de poussières de silice précipitée chez 165 travailleurs exposés en moyenne durant 8,6 années. Les expositions mensuelles moyennes ont été évaluées qualitativement (sur une échelle de 1 à 4) et un indicateur d'exposition cumulée calculé pour chacun. Aucun des indicateurs spirométriques retenus (capacité vitale forcée [CVF], volume maximal expiré en une seconde [VEMS], débit expiratoire maximal 25-75 [DEM₂₅₋₇₅]) n'était corrélé à la dose ou à la durée d'exposition. Parmi les 143 personnes suivies par radiographie et exposées uniquement à la silice précipitée, aucune ne présentait de pneumoconiose apparente, même chez quelques travailleurs exposés jusqu'à 35 années ; les 11 personnes qui présentaient des indices de cette atteinte avaient auparavant été exposées à des poussières connues pour receler de la silice cristalline. Les auteurs n'ont pas inclus de groupe témoin.

Choudat et coll. (1990) ont comparé les fonctions respiratoires d'un groupe de 41 ouvriers exposés à la poussière de silice amorphe précipitée à celles d'un groupe témoin de 90 travailleurs de la même usine et de statut socio-économique comparable. La silice amorphe utilisée contenait 3,8 % de poussières alvéolaires. Trente-six

échantillonnages d'une durée de 5 h 40 ont été effectués en conditions de travail réel. Les niveaux d'exposition allaient de 0 à 10,5 mg·m⁻³ (fraction inhalable) et de 0 à 3,4 mg·m⁻³ (fraction alvéolaire). La durée d'exposition moyenne était de 8 années (étendue de 1 à 28 ans). Toutes les valeurs spirométriques étaient plus faibles dans le groupe exposé, avec des différences statistiquement significatives pour VEMS/CVF, DEM₂₅₋₇₅, DEM₅₀, et DEM₇₅. Cependant, aucun paramètre n'était corrélé à l'indice d'exposition calculé. Les auteurs concluent que l'exposition aux poussières de silice amorphe précipitée peut induire une légère atteinte des petites voies respiratoires, aggravée par le tabagisme. Toutes les radiographies étaient normales. Remarquons que les durées et les intensités d'expositions étaient relativement faibles.

Spain et coll. (1995) ont étudié le cas d'une femme de 38 ans, ayant travaillé 21 mois dans une usine de fabrication d'aliments pour animaux, atteinte d'une bronchite chronique obstructive. Cette femme a été exposée à différents types de poussières organiques, à des microorganismes, à des enzymes protéolytiques, et à des poussières minérales (silice amorphe précipitée [Sipernat 22], présentée comme « *synthetic silicates* », et « *amorphous silica*, (crystalline silica, aluminum silicate, bentonite) » [sic !]). Les symptômes subsistaient 6 mois après le retrait de l'exposition. Le liquide de lavage broncho-alvéolaire contenait des macrophages (85 %), des lymphocytes et des neutrophiles, ainsi que des particules de silice. Une biopsie révélait la présence de particules de silicates. En dépit de cette exposition complexe et mal caractérisée, les auteurs pensent que la silice amorphe a pu jouer un rôle dans la survenue, plutôt rapide, de cette pathologie.

3.4.3. Fumées de silice

Dès 1949, Broch signale que 50 % de 21 travailleurs employés à la préparation de ferro-silicium ou de ferrochrome présentent une silicose avérée après 16 à 19 années d'exposition. L'un d'eux avait une silicose de degré I après avoir été employé au chargement du four pendant 7 années, et 3 souffraient d'incapacités accusées après 16 à 18 ans de travail. L'analyse chimique de la poussière récupérée en différents endroits montrait un contenu en silice de 48 % à plus de 80 % ; l'examen aux rayons X montrait qu'il s'agissait de silice amorphe. Les examens pratiqués sur les ouvriers travaillant à la préparation des ferro-chromes ne montrèrent aucune silicose après 13 années de travail. L'auteur pense que le risque de silicose y est moins élevé.

Il est à signaler que l'on ne dispose dans ce cas que d'un résumé d'un quart de page. Les antécédents professionnels ou les âges des personnes examinées ne sont pas donnés.

Swensson et coll. (1971) ont recherché 10 travailleurs déjà examinés par Bruce en 1937. L'un d'eux, considéré comme atteint en 1935 d'une silicose de degré 2 après 5 ans dans une usine de fabrication de ferro-silicium, présentait une radiographie thoracique normale en 1944, puis à nouveau en 1958. Sa fonction pulmonaire était également

normale. Un autre, fortement atteint (après 4 ans d'exposition), présentait à la radiographie une réticulation et de nombreux nodules. À l'autopsie, 8 ans plus tard, l'examen microscopique n'a révélé aucune caractéristique de la silicose. Au total, le diagnostic de silicose n'a pu être confirmé que dans un seul cas. Les auteurs concluent que ces poussières de ferro-silicium sont fort peu silicogènes. Il n'y a pas de données d'exposition, seulement des durées d'activité professionnelle dans l'usine.

Dans une publication très peu détaillée, Davies (1974) relève 14 radiographies évocatrices de pneumoconiose chez des travailleurs (nombre non précisé) exposés à des poussières de four de fabrication de silico-chrome ($\text{SiO}_2 > 95 \%$, Cr_2O_3 2,4 %, 90 % des particules $< 2 \mu\text{m}$). Ces cas devinrent évidents après 10 années de suivi régulier. Reprenant les radiographies passées et sélectionnant toutes les suspectes, il fut constaté que les longues durées d'exposition (6 cas > 10 années, 4 entre 5 et 10 ans) et certains métiers (chargement et suivi du four) étaient sur-représentés.

Taylor et Davies ont rapporté en 1977 un cas d'atteinte pulmonaire chez un travailleur de 27 ans employé depuis 3,5 ans à la production de ferro-alliages. Une biopsie fut examinée par J.C. Wagner, lequel a décrit « la présence de 4 foyers de réticulation avec formation de collagène. La poussière est présente dans les macrophages et le tissu interstitiel. Elle semble constituée de particules fines, non biréfringentes à la lumière polarisée ». Après calcination, l'examen de la poussière en laboratoire spécialisé « montrait des particules arrondies de silice pure. (...) Il semble qu'il y ait une réaction tissulaire à la silice, laquelle, selon toute apparence, est amorphe ». Les auteurs sont d'avis que la silice amorphe peut avoir autant des effets aigus qu'à long terme (pneumoconiose).

Vitums et coll. (1977) ont trouvé des anomalies radiographiques (opacités réticulaires et nodulaires) chez 11 des 40 travailleurs examinés, exposés de façon intermittente pendant 11 à 18 années à de la silice amorphe formée par recondensation d'émissions d'un four électrique. Les particules étaient rondes, opaques, de diamètres de moins de $0,05 \mu\text{m}$ à $0,75 \mu\text{m}$. L'examen aux rayons X montrait la présence d'un peu de silice cristalline (non quantifiée) et de feldspath. Une biopsie pulmonaire a révélé « une fibrose péribronchique et périvasculaire accusée, des amas de pigments anthracotiques dans les tissus conjonctifs, de nombreux macrophages intra-alvéolaires chargés de fines particules brunes à noires, et un emphysème modéré. L'examen aux rayons X indique une structure semblable à celle décrite pour la poussière de silice amorphe analysée précédemment ». L'institut de pathologie soulignait que « dans ce cas, les nodules fibrohistiocytiques présentent des similitudes avec ce qui est décrit dans les pneumoconioses expérimentales à la silice amorphe », mais hésitait à conclure définitivement en l'absence d'autres cas décrits.

Brambilla et coll. (1980) ont étudié 10 salariés d'une usine de fabrication de silicium présentant par radiographie pulmonaire un syndrome interstitiel. Tous étaient asymptomatiques ou présentaient des symptômes faibles, sauf un, affecté d'une dyspnée

marquée. La spiropgraphie a révélé un syndrome restrictif pur d'importance variable. Les modifications cliniques, radiologiques et fonctionnelles étaient en rapport avec la durée d'exposition et les tâches effectuées. Une partie du travail de ces personnes consistait à charger dans le four du sable mouillé provenant d'une trémie ; l'exposition au quartz pouvait donc être considérée comme négligeable. Les opérations de piquage dans le four provoquaient d'importantes émissions de fumées. Six patients ont subi une fibroscopie avec lavage alvéolaire et biopsie transbronchique, une biopsie chirurgicale a été pratiquée chez deux d'entre eux. L'étude ultrastructurale a montré une fibrose interstitielle et des granulomes nodulaires, sans nodules scléro-hyalins caractéristiques de la silicose. Les macrophages prélevés contenaient de très nombreux sphérules de silice amorphe, de diamètres compris entre 0,02 et 0,5 μm . Moins de 1 % des particules pulmonaires examinées (nombre non précisé) sont du quartz (repéré sous forme de particules cubiques de plus grande taille, et cristallines). Les auteurs concluent que la silice amorphe paraît responsable des lésions radiologiques et histologiques observées, et que cette pneumoconiose diffère de la silicose.

Langård (1980) a étudié la fonction respiratoire (syndromes obstructifs) de trois groupes de travailleurs employés à la production de ferro-chrome et de ferro-silicium (dans la même usine que celle étudiée par Broch en 1949) : le premier, de 60 personnes ayant travaillé principalement aux fours de ferro-chrome ou dans leur voisinage, le deuxième de 33 personnes (postes similaires aux fours de ferro-silicium), et le dernier, de 47 ouvriers de maintenance. Le groupe de référence était constitué de 25 travailleurs employés depuis moins de 5 années dans cette même usine, en moyenne de 15 ans plus jeunes, ce qui impliquait la prise en compte de l'influence de l'âge dans les paramètres étudiés. Les niveaux d'exposition aux poussières allaient de 3 à 28 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$; l'atmosphère proche du four de ferro-silicium contenait de 0,02 à 0,19 mg de chrome total par mètre cube, dont 11 à 33 %, soluble dans l'eau, était considéré comme constitué principalement de chrome (VI). Langård a trouvé une prévalence nettement supérieure de syndromes obstructifs dans les groupes exposés, mais n'a pu la mettre en relation avec l'exposition au Cr (VI) ; il considère que les symptômes auraient pu résulter de l'exposition aux poussières de silice amorphe émise par les fours, mais n'ose s'appuyer sur la publication de Vitums et coll. (1977), pas assez concluante à son avis, et est gêné par la non-observation de pneumoconioses par radiographie (des films 10 $\times$ 10 cm ont été utilisés, ce qui n'est pas satisfaisant au vu des conclusions de Oechsli et coll., 1961). Il signale également l'utilisation d'amiante, qui aurait pu contribuer à la dégradation des fonctions pulmonaires dans les trois groupes étudiés. Il conclut finalement que les fortes expositions à ces poussières mixtes et la présence de silice amorphe pourraient expliquer l'ensemble des effets observés.

Ratney (1988) souligne que les fumées de silice se révèlent nettement plus toxiques que les silices précipitées, produisant des effets complexes lors d'expositions chroniques comme aiguës, effets réversibles à la cessation de l'exposition. Selon lui, l'exposition à

des pics induit des symptômes de « la fièvre des métaux », qui peuvent persister jusqu'à trois mois, l'exposition chronique induisant l'apparition de modifications pulmonaires visibles par radiographie. Une valeur limite de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ était proposée.

L'ACGIH a proposé en 1992 de faire passer la TLV des fumées de silice de $0,2$ à $2 \text{ mg}/\text{m}^3$; cette proposition ne paraissait pas justifiée à Cunningham et coll. (1998), notamment parce que :

- une partie importante des particules de fumée de silice est constituée de particules ultra-fines, et l'une des études proposant une valeur limite de $2 \text{ mg}/\text{m}^3$ excluait les particules ultra-fines du champ d'application ;
- il existe des indications que les fumées de silice peuvent provoquer des affections pulmonaires chroniques (fibroses...) même si, dans de nombreux cas, il y a pu y avoir coexposition à, ou contamination par, la silice cristalline ;
- une partie des études concernait des silices précipitées, qui peuvent avoir une dangerosité plus faible que les fumées de silice.

Conclusion

Les études sur l'animal montrent dans leur ensemble que les particules ultra-fines de silice amorphe entraînent rapidement une inflammation pulmonaire importante mais peu durable. En comparaison, le quartz entraîne une inflammation pulmonaire d'apparition progressive mais persistante. Les effets pulmonaires à court terme des silices amorphes sont nettement plus importants que ceux d'autres PUF, comme le noir de carbone ou les particules diesels. Les silices amorphes n'entraînent des lésions de type silicotique que très localisées, et au moins partiellement réversibles. Des particules de silice amorphe sont trouvées dans les ganglions lymphatiques suite à des expositions par voie respiratoire.

Les silices amorphes composées de particules ultra-fines (silices pyrogénées, précipitées, colloïdales et gels de silice) ne sont que faiblement biopersistantes. Ceci peut être dû au moins partiellement à leur solubilité, faible mais non négligeable, dans les fluides biologiques.

Les études montrent l'importance de la réactivité de surface, en particulier des groupements silanol, pour la cytotoxicité des silices amorphes. Une diminution de la taille des particules entraîne, à masse constante, une augmentation de la toxicité cellulaire.

La plupart des données humaines concernent les expositions aux fumées de silice (sous-produits de la métallurgie du silicium). Certaines mettent en évidence l'apparition de fibrose, le plus souvent en présence d'expositions conjointes ou antérieures à la silice cristalline ; il ne semble donc pas possible de tirer des conclusions quant au pouvoir silicogène des fumées de silice. Il n'existe pas d'indication d'un pouvoir silicogène pour

les silices synthétiques. Le CIRC (1997) conclut que les données ne donnent pas d'indication adéquate relative à la cancérogénicité de la silice amorphe synthétique chez l'animal ou chez l'homme.

Bibliographie

- Aïtcin PC, Pinsonneault P, Roy DM (1984). Physical and chemical characterization of condensed silica fumes. *Am Ceram Soc Bul* **63**, 1487-1491.
- Albrecht C, Schins RP, Hohn D, Becker A, Shi T, Knaapen AM, Borm PJ (2004). Inflammatory Time Course after Quartz Instillation: Role of Tumor Necrosis Factor- α and Particle Surface. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**, 292-301.
- Borm P, Klaessig FC, Landry TD, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K, Trottier R, Wood S (2006). The Role of Dissolution in Biological Fate and Effects of Nanoscale Particles. *Toxicol Sci* **90**, 23-32.
- Brambilla C, Brambilla E, Rigaud D, Perdrix A, Paramelle B, Fourcy A (1980). Pneumoconiose aux fumées de silice amorphe : étude minéralogique et ultrastructurale de 6 cas. *Rev Fr Mal Resp* **8**, 383-391.
- Broch C (1949). An investigation of the occurrence of silicosis in a plant for fusing ferrosilicon and ferro-chromium. *Nord Hyg Tidskr* (1), 1-7 ; résumé d'un quart de page dans *J Ind Hyg Toxicol* **31**, 97.
- Chen M, von Mikecz A (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exper Cell Res* **305**, 51-62.
- Chevallier Y (1990). Silices amorphes synthétiques. *Sci Ingé* **J4-J6020**, 2233-2237.
- Choudat D, Frisch C, Barrat G, el Kholti A, Conso F (1990). Occupational exposure to amorphous silica dust and pulmonary function. *Br J Occup Med* **47**, 763-766.
- CIRC (1997). IARC Monographs volume 68. Silica. Crystalline silica - inhaled in the form of quartz or cristobalite from occupational sources (Group 1). Amorphous silica (Group 3), p. 41.
- Cunningham EA, Jablonski W, Todd JJ (1996). Electron microscopy studies of silica fume emissions from a silicon smelter in southern Tasmania, Australia. *Am Ind Hyg Assoc J* **57**, 1024-1034.
- Cunningham E.A, Todd JJ, Jablonski W (1998). Was there sufficient justification for the 10-fold increase in the TLV for silica fume? A critical review. *Am J Ind Med* **33**, 212-223.
- Davies (1974). Inhalation hazards in the manufacture of silicon alloys. *Centr Afr J Med* **20**, 140-143.
- Élias Z, Poirot O, Danière MC, Terzetti F, Marande AM, Dzwigaj S, Pézerat H, Fenoglio I, Fubini B (2000). Cytotoxic and transforming effects of silica particles with different surface properties in Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Toxicol In Vitro* **14**, 409-422.
- Engh KR (2001). Diatomite. Encyclopedia of Chemical technology. Fourth Edition, John Wiley & Sons, Volume 8, 108-118.
- Ernst H, Rittinghausen S, Bartsch W, Creutzenberg O, Dasenbrock C, Gorlitz BD, Hecht M, Kairies U, Muhle H, Muller M, Heinrich U, Pott F (2002). Pulmonary inflammation in rats

- after intratracheal instillation of quartz, amorphous SiO₂, carbon black, and coal dust and the influence of poly-2-vinylpyridine-N-oxide (PVNO), *Exp Toxicol Pathol* **54**, 109-126.
- Ferch H, Toussaint HE (1996) Synthetic amorphous silicas in fine powder form – Definitions, Properties and manufacturing processes. *Kautschuk Gummi Kunststoff* **49**, 589-596.
- Fubini B (1998a). Surface chemistry and quartz hazard. *Ann Occup Hyg* **42**, 521-530.
- Fubini B (1998b). Health effects of silica. In : *The properties of silicas*, edited by AP Legrand, pp. 415-464.
- Fubini B, Fenoglio I, Ceschino R, Ghiazza M, Martra G, Tomatis M, Borm P, Schins R, Bruch J (2004). Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo. *Int J Hyg Environ Health* **207**, 89-104.
- Guthrie GD, Heanney PJ (1995). Mineralogical characteristics of silica polymorphs in relation to their biological activities. *Scand J Work Environ Health* **21** (suppl. 2), 5-8.
- Johnston CJ, Driscoll KE, Finkelstein JN, Baggs R, O'Reilly MA, Carter J, Gelein R, Oberdörster G (2000). Pulmonary chemokine and mutagenic response in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol Sci* **56**, 405-411.
- Klosterkötter W (1966). Erzeugung einer Silikose durch Inhalation amorpher Lichtbogen-Kieselsäure im Tierexperiment. *Arch Hyg Bakteriol* **150**, 542-547.
- Klosterkötter W, Robock K (1975). New aspects on dust and pneumoconiosis research. *Am Ind Hyg Assoc J* **36**, 659-668.
- Knaapen AM, Albrecht C, Becker A, Hohr D, Winzer A, Haenen GR, Borm PJ, Schins RP (2002). DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: role of surface reactivity and neutrophilic inflammation. *Carcinogenesis* **23**, 1111-1120.
- Kolderup H (1977). Particle size distribution of fumes formed by ferrosilicon production. *Air Poll Control Assoc J* **27**, 127-130.
- Kuhn DC, Demers LM (1992). Influence of mineral dust surface chemistry on eicosanoid production by the alveolar macrophage. *J Toxicol Environ Health* **35**, 39-50.
- Kuhn DC, Demers LM (1995). Effect of surfactant on basal and silica-induced eicosanoid production by the alveolar macrophage. *Am J Physiol* **269** (2 Pt 1) L165-L170.
- Langård S (1980). A survey of respiratory symptoms and lung function in ferrochromium and ferrosilicon workers. *Int Arch Occup Environ Health* **46**, 1-9.
- Lee KP, Kelly DP (1992). The pulmonary response and clearance of Ludox colloidal silica after a 4-week inhalation exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol* **19**, 399-410.
- Lee KP, Kelly DP (1993). Translocation of particle-laden alveolar macrophages and intra-alveolar granuloma formation in rats exposed to Ludox colloidal amorphous silica by inhalation. *Toxicology* **77**, 205-222.
- Lewinson J, Mayr W, Wagner H (1994) Characterisation and toxicological behavior of synthetic amorphous hydrophobic silica. *Regulat Toxicol Pharmacol* **20**, 37-57.
- Mao Y, Daniel LN, Knapton AD, Shi X, Saffiotti U (1995). Protective Effects of Silanol Group Binding Agents on Quartz Toxicity to Rat Lung Alveolar Cells. *Appl Occup Environ Hyg* **10**, 1132-1137.
- McDonald JW, Roggli VL (1995). Detection of silica particles in lung tissue by polarizing light microscopy. *Arch Pathol Lab Med.* **119**, 242-246.

- McLaughlin JK, Chow WH, Levy LS (1997). Amorphous silica: a review of health effects from inhalation exposure with particular reference to cancer. *J Toxicol Environ Health*. **50(6)** 553-566.
- Merget R, Bauer T, Küpper HU, Philippou S, Bauer HD, Breitstadt R, Bruening T (2002) Health hazards due to inhalation of amorphous silica. *Arch Toxicol* **75**, 625-634.
- Morfeld P, Albrecht C, Drommer W, Borm PJA (2006) Dose-response and threshold analysis tumor prevalence after intratracheal instillation of six types of low- and high-surface- area particles in a chronic rat experiment. *Inhalat Toxicol* **18**, 215-225.
- Murphy SA, Bérubé A, Pooley FD, Richards RJ (1998) The response of lung epithelium to well characterised fine particles. *Life Sci* **62**, 1798-1799.
- Oechsli WR, Jacobson G, Brodeur AE (1961). Diatomite pneumoconiosis: roentgen characteristics and classification. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. **85**, 263-270.
- Pandurangi RS, Seehra MS, Razzaboni BL, Bolsaitis P (1990) Surface and bulk infrared modes of crystalline and amorphous silica particles: a study of the relation of surface structure to cytotoxicity of respirable silica. *Environ Health Perspect* **86**, 327-336.
- Perdrix A, morin B, Reynaud C, Brambilla C, Chinal A (1984). Risques de pneumoconiose dans 2 usines de fabrication de silicium. *Arch Mal Prof* **45**, 292-296.
- Plunkett ER, deWitt B (1962). Occupational exposure to Hi-sil and Silene. Report of an 18-year study. *Arch Environ Health* **5**, 75-78.
- Policard A, Collet A (1954). Toxic and fibrosing action of submicroscopic particles of amorphous silica. *AMA Arch Ind Hyg* **9**, 389-395.
- Princi F, Miller LH, Davis A, Cholak J (1962). Pulmonary disease of ferroalloy workers. *J Occup Med* **4**, 301-310.
- Prochazka R (1971). Staubbmessungen im Arbeitsbereich von Elektroöfen für Ferrolegierungen. 1. Teil: Messungen an Ferrosilizium-Elektroöfen. *Staub* **9**, 361-366.
- Ratney RS (1988). The Threshold Limit Value for Various Forms of Amorphous Silica. Proceedings of the VIIth International Pneumoconioses Conference, Part II. Pittsburgh, Pennsylvania, August 23-26, 1988.
- Reuzel PJ, Bruijntjes JP, Feron VJ, Woutersen RA (1991). Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats. *Fd Chem Toxicol* **29**, 341-354.
- Rosenbruch M (1992). Inhalation of amorphous silica: morphological and morphometric evaluation of lung associated lymph nodes in rats. *Exp Toxicol Pathol* **44**, 10-14.
- Schepers GW, Durkan TM, Delahant AB, Creedon FT, Redlin AJ (1957a). The biological action of Degussa submicron amorphous silica dust (Dow Corning silica). I. Inhalation studies on rats. *AMA Arch Ind Health* **16**, 125-146.
- Schepers GW, Durkan TM, Delahant AB, Creedon FT, Redlin AJ (1957b). The biological action of inhaled Degussa submicron amorphous silica dust (Dow Corning silica). II. The pulmonary reaction in uninfected guinea pigs. *AMA Arch Ind Health* **16**, 203-224.
- Schepers GW (1981). Biological action of precipitation-process submicron amorphous silica (HI-SIL 233). *ASTM Spec Tech Publ* **732**, 144-173.
- Schins RP, Duffin R, Hohn D, Knaapen AM, Shi T, Weishaupt C, Stone V, Donaldson K, Borm PJ (2002). Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol* **15**, 1166-1173.
- SL (2001). Silices – Le marché reste bien orienté. *Info Chimie Mag* **420**, 72-75.

- Spain BA, Cumming O, Garcia JGN (1995) Bronchiolitis Obliterans in an animal feed worker. *Am J Ind Med* **28**, 437-443.
- Swensson A, Kvarnström K, Bruce T, Edling NP, Glomme J (1971). Pneumoconiosis in ferro-silicon workers - A follow-up study. *J Occup Med* **13**, 427-432.
- Taddei L, Cristofolini A, Bradamente D (1979). Valutazione dell'esame radiologico del torace di 90 operai addetti alla produzione di leghe al silicio. *Radiol Med* **65**, 717-721.
- Taylor DM, Davies (1977). Ferro-alloy worker's disease. A report of a recent case against the background of twelve years' experience. *Centr Afr J Med* **23**, 28-32.
- Vaillant G, Simon G, Fade O, Royer E, Bach D, Gradiski D (1983). Pneumoconiose aiguë à silice amorphe. *Rev Fr Mal Resp* **11**, 504-505.
- Vitums VC, Edwards MJ, Niles NR, Borman JO, Lowry RD (1977). Pulmonary fibrosis from amorphous silica dust, a product of silica vapor. *Arch Environ Health* **32**, 62-68.
- Volk H (1960). The health of workers in a plant making highly dispersed silica. *Arch Environ Health* **1**, 47-50.
- Waddell WH, Evans LR (1997). Silica (amorphous). Encyclopedia of Chemical technology. Fourth Edition, John Wiley & Sons, Volume 21, 1005-1032.
- Warheit DB, Achinko L, Hartsky MA, Carakostas MC (1990). Pulmonary autoradiographic and biochemical responses in rats following subchronic inhalation exposures to Ludox colloidal silica. *Toxicologist* **10**, 202 (résumé n° 808).
- Warheit DB, Carakostas MC, Kelly DP, Hartsky MA (1991). Four-week inhalation study with Ludox colloidal silica in rats: pulmonary cellular responses. *Fund Appl Toxicol* **16**, 590-601.
- Warheit DB, McHugh TA, Hartsky MA (1995). Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts. *Scand J Work Environ Health* **2** (Suppl 2), 19-21.
- Warheit DB (2001) Inhaled amorphous silica particulates: what do we know about their toxicological profiles? *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **20** (Suppl. 1), 133-141.
- Warshawsky D, Reilman R, Cheu J, Radike M, Rice C (1994) Influence of particule dose on the cytotoxicity of hamster and rat pulmonary alveolar macrophage *in vitro*. *J Toxicol Environ Health* **42**, 407-421.
- Wilson RK, Stevens PM, Lovejoy HB, Bell ZG, Richie RC (1979). Effects of chronic amorphous silica exposure on sequential pulmonary function. *J Occup Med* **21**, 399-402.
- Wottrich R, Diabaté S, Krug HF (2004). Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int J Hyg Environ Health* **207**, 353-361.

4. Fumées de soudage

A. Laudet, B. Courtois

Introduction

B. Courtois

Le soudage est une technique d'assemblage de base par l'intermédiaire d'une phase liquide provenant de la fusion d'une partie des matériaux, avec éventuellement un matériau d'apport. Il concerne essentiellement les alliages métalliques et les matières plastiques. Dans ce chapitre, le soudage à l'arc des matériaux métalliques est seul abordé, cette technique étant très utilisée et particulièrement génératrice de fumées contenant une forte proportion de particules ultra-fines.

Le soudage à l'arc permet d'assembler des métaux et alliages métalliques rendus liquides par la température élevée produite par le passage d'un fort courant électrique entre deux conducteurs. Des températures de l'ordre de 12 000 °C peuvent être atteintes dans l'arc, qui chauffe à la fois le métal de base et le métal d'apport, introduit en continu dans l'arc ou servant d'électrode. Le soudage à l'arc entraîne la formation de nombreux sous-produits gazeux ou particulaires (Zimmer, 2002), dont nature et proportions dépendent des alliages de base et d'apport, de la composition de l'éventuel enrobage de l'électrode, de la technique de soudage utilisée, mais aussi des produits pouvant recouvrir les pièces soudées (graisse, peinture...).

Le tableau ci-après (tableau 5.XI) donne les principaux oxydes métalliques et polluants gazeux susceptibles d'être retrouvés dans les fumées en fonction du procédé de soudage et du métal d'apport (BG, 1996 ; Voitkevich, 1992).

Voitkevich (1992) a effectué une revue des propriétés physiques et chimiques des fumées de soudage. La microscopie électronique en transmission montre que la taille des particules élémentaires varie essentiellement entre quelques centièmes et quelques dixièmes de micromètres, quelques pour cents en nombre des particules pouvant atteindre 10 à 15 µm. La distribution en taille des particules est log-normale avec une légère dépendance de la taille moyenne et de la distribution selon la nature de l'alliage d'apport et selon la technique de soudage. Dans l'atmosphère, les particules de soudage forment des agglomérats sous forme de chaînes dont la taille varie généralement entre 1 et 2 µm. La taille des agglomérats augmente avec la concentration en éléments alcalins dans l'enrobage des électrodes.

Les aérosols émis lors d'opérations de soudage sur chantier naval ont été étudiés par Wehner et coll. (2001). Les distributions en nombre des particules élémentaires étaient réparties entre 3 et 800 nm, la plus forte concentration étant le plus souvent observée entre 140 nm et 420 nm. Les éléments dominants étaient Fe, K, Mn et Zn. Le maximum

Procédé	Métal d'apport	Principaux composés possibles dans les fumées	Émissions totales de poussières (mg/s)
Soudage à l'arc manuel	Aciers non alliés et faiblement alliés	Fer, manganèse, silicium, potassium, sodium, titane, aluminium, calcium, magnésium sous forme d'oxydes et de fluorures si présent dans l'enrobage	4 - 18
	Aciers chrome-nickel	Chromates, Cr ₂ O ₃ , fer, manganèse, silicium, potassium, sodium, titane, aluminium, calcium, magnésium sous forme d'oxydes et de fluorures si présent dans l'enrobage	2 - 22
	Alliages de nickel	Oxydes de nickel, chromates, Cr ₂ O ₃ , CoO, oxyde de cuivre	De l'ordre de 7
Soudage à l'arc avec électrode fusible, sous atmosphère active (MAG)	Aciers non alliés et faiblement alliés	Oxydes de fer, CO	
	Aciers chrome - nickel	Oxydes de nickel, Cr ₂ O ₃ , CO	
Soudage à l'arc sous dioxyde de carbone avec électrode fusible	Aciers non alliés et faiblement alliés	CO, oxydes de fer	2 - 12
Soudage à l'arc en atmosphère inerte avec électrode fusible (MIG)	Alliages de nickel	Oxyde de nickel, oxyde de chrome, CoO, oxyde de cuivre, ozone	2 - 6, oxydes de nickel < 5
	Alliages d'aluminium	Ozone, Al ₂ O ₃ , SiO ₂ , MgO	
Soudage à l'arc en atmosphère inerte avec électrode de tungstène	Aciers non alliés et faiblement alliés	Oxydes de fer, ozone	
	Aciers chrome-nickel	Oxydes de fer, de chrome, de nickel, ozone	
	Alliages de nickel	Oxyde de nickel, ozone	
	Alliages d'aluminium	Ozone, Al ₂ O ₃ , SiO ₂ , MgO, ThO ₂ (en cas d'électrodes en tungstène thorié)	

Tableau 5.XI. Émissions particulaires par différents procédés de soudage.

de concentration en nombre a été observé pour un diamètre de 10 nm environ pendant les heures de la matinée où la plupart des soudeurs étaient simultanément au travail. Pendant les postes de nuit où le nombre de salariés présents est plus restreint, les concentrations de particules étaient significativement plus faibles, et le diamètre moyen variait entre 100 et 300 nm.

Stephenson et coll. (2003) ont étudié l'exposition de travailleurs aux particules submicroniques lors du soudage manuel à l'arc d'acier au carbone. Deux appareils ont été utilisés pour des mesures en nombre, un analyseur de mobilité des particules à balayage (SMPS, *Scanning Mobility Particle Sizer*) permettant des mesures entre 14 et 600 nm, et un compteur optique de particules (OPC) permettant des mesures entre 0,3 et 10 μm . Des mesures en masse, réalisées avec un impacteur en cascade, ont montré que 80 % des particules ont un diamètre inférieur à 1 μm . Les mesures effectuées avec le SMPS montrent que, durant le soudage, le nombre de particules entre 0,05 μm et 0,5 μm augmente de un à deux ordres de grandeur par rapport au nombre de particules en l'absence de soudage, alors que le nombre des particules les plus grosses reste approximativement constant. La concentration en nombre de particules était de l'ordre de $2 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$ à environ 8,5 m du poste de soudage. La distribution des particules était approximativement log-normale avec un diamètre moyen de 120 nm. Les résultats obtenus avec l'OPC sont en assez bon accord avec ceux provenant du SMPS compte tenu de la différence des principes de mesure. Des observations de particules déposées sur filtre par microscopie électronique à balayage montrent que la taille des particules élémentaires est homogène dans les agrégats mais varie d'un agrégat à l'autre.

Lähde et coll. (2004) ont mesuré par SMPS les concentrations en nombre de particules des fumées formées lors de la mise en œuvre de différents procédés de soudage ; la plupart des procédés émettaient des particules à distribution bimodale. Le diamètre médian (diamètre équivalent en mobilité électrique) le plus fréquent était de l'ordre de 90 à 200 nm ; l'autre mode dépassait les 200 nm. Les tailles des particules couvraient de 10 nm à environ 450 nm. Les concentrations en nombre de particules (10^6 à 10^7 cm^{-3}) et les granulométries dépendaient des différents paramètres.

En résumé, une forte proportion des particules élémentaires composant les fumées de soudage ont des diamètres ne dépassant pas 100 nm. Ces particules s'agglomèrent sous forme de chaînes dont la taille est de l'ordre du micromètre. La composition des fumées de soudage dépend en premier lieu de la composition des métaux d'apport et de base mais également de l'éventuel enrobage de l'électrode et du revêtement présent sur les pièces, ainsi que de la technique de soudage utilisée.

Le soudage est une technique très utilisée en milieux professionnels, ses effets potentiels concernent donc une population importante, et il émet en général une forte proportion de PUF, ce qui justifie cet examen spécifique.

4.1. Effets sur la santé humaine

A. Laudet

Les effets des fumées de soudage sur la santé humaine ont fait l'objet d'une étude très documentée (Antonini, 2003) qui a servi de base à la synthèse présentée ci-après ; les références bibliographiques en sont reproduites pour information, mais n'ont pas été ré-étudiées et ne sont pas reprises dans la liste bibliographique.

Cette synthèse présente des données épidémiologiques, qui ont mis en évidence des pathologies variées attribuables aux fumées de soudage, ainsi que des données expérimentales sur l'animal de laboratoire ; ces dernières ont cherché chez le rongeur soit les effets consécutifs à une exposition unique ou répétée, soit l'action spécifique d'une substance chimique particulière identifiée par analyse de ces fumées. C'est ainsi qu'un certain nombre d'effets ont pu être reliés à l'action de métaux ou d'oxydes métalliques.

Il est clair qu'il était difficile d'isoler les effets des PUF indépendamment de leur contexte, mais il a été possible dans certains cas d'émettre des hypothèses quant à leur rôle dans les pathologies observées.

4.1.1. Effets sur le système respiratoire

| Altérations de la fonction pulmonaire

Les perturbations de la fonction pulmonaire sont objectivées par des tests fonctionnels visant à détecter des processus pathologiques tels que fibroses ou emphysèmes pulmonaires qui respectivement restreignent la distension pulmonaire ou réduisent l'élasticité pulmonaire ; ces tests, couramment utilisés en milieu professionnel, mesurent les volumes respiratoires dans des conditions normales ou forcées. Ils ne sont toutefois pas très sensibles et des lésions irréversibles peuvent s'installer avant qu'ils ne soient perturbés.

Les résultats varient avec le type d'études (menées en atmosphères strictement contrôlées, en conditions réelles de travail ou en laboratoire). La sévérité de l'exposition professionnelle dépend des procédés, des matériaux utilisés, de la durée et des conditions d'exposition. Stern (1981) montre en outre que certains facteurs confondants (tabagisme, dynamique des populations – les sujets atteints de troubles respiratoires sont enclins à changer de métier – et forte incidence des maladies respiratoires chroniques chez les soudeurs des chantiers navals) peuvent modifier les résultats de ces tests. Finalement, après une analyse extensive de la littérature, Sferlazza et Beckett (1991) concluent qu'aucune étude n'a pu montrer que la seule exposition quotidienne au soudage entraînait des altérations pulmonaires cliniquement détectables. La majorité des études (Oxhoj et coll., 1979 ; McMillan et coll., 1979 ; Kemig et coll., 1983)

montrent peu ou pas d'effets mesurables, exceptée une diminution de la capacité pulmonaire chez des sujets particulièrement sensibles ou massivement exposés dans de mauvaises conditions de ventilation (espaces confinés ; Oxhoj et coll., 1979 ; Chinn et coll., 1990 ; Mur et coll., 1985).

En dépit de nombreuses mesures, il n'a pas été possible d'associer clairement une exposition donnée à une manifestation aiguë. De plus, lorsque des perturbations étaient observées, elles l'étaient uniquement durant l'exposition et disparaissaient spontanément pendant la période de repos. Des études ont montré des altérations de la capacité respiratoire chez les soudeurs, notamment chez ceux pratiquant le soudage manuel avec des électrodes en acier inoxydable (Sobaszek et coll., 2000 ; Mur et coll., 1985)

| Asthme

L'exposition à des fumées de soudage générées par des électrodes en acier inoxydable peut entraîner des asthmes professionnels, notamment en présence d'un fort taux de chrome et/ou de nickel, métaux connus pour entraîner des phénomènes d'hypersensibilité des voies aériennes supérieures. Certaines études suggèrent l'existence d'une association entre asthme professionnel et exposition aux fumées de soudage (Boulet, 1992 ; Simonsson, 1995 ; Beach et coll., 1996 ; Toren, 1996), mais d'autres (Sferlazza et coll., 1991) n'ont pas établi un tel lien.

| Fièvre des métaux

Encore appelée fièvre des soudeurs, des fondeurs, des zingueurs, ou des braseurs, la « fièvre des métaux » est la pathologie respiratoire aiguë la plus répandue chez les soudeurs. Elle est due à l'inhalation d'oxyde de zinc formé extemporanément, mais elle peut survenir également avec des fumées à base de cuivre, magnésium ou cadmium. Les symptômes apparaissent quatre heures environ après l'exposition et sont assez similaires à ceux d'une grippe avec sensation de soif, toux sèche, goût métallique dans la bouche, frissons, douleurs musculaires, nausées, céphalées, fièvre (Liss, 1996). Les symptômes disparaissent spontanément en 24 à 48 heures. Une tolérance peut se développer après des exposition répétées, ce qui explique les effets observés le lundi matin consécutifs à l'interruption de fin de semaine (Palmer et coll., 1998).

Une étude (Gordon et coll. 1992) a été effectuée sur des volontaires humains exposés pendant deux heures à des particules ultra-fines d'oxyde de zinc (5 mg/m^3). Dans les 6-10 heures après exposition, il a été constaté un ou plusieurs des symptômes de la fièvre des métaux, réversibles en 24 heures.

L'hypothèse la plus plausible sur le mécanisme de ces affections (Blanc, 1991) met en jeu une réponse cellulaire de type inflammatoire sous l'action des oxydes métalliques.

On constate d'ailleurs une augmentation du nombre de macrophages et de polynucléaires neutrophiles dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) des sujets exposés à ce type de fumées. Les macrophages activés libéreraient des cytokines, médiateurs de l'inflammation, avec un rôle majeur du TNF- α dans la réponse initiale, relayé ensuite par les interleukines IL-6 et IL-8.

Pour plus de détails, voir le chapitre 5, point 1.

| Bronchites chroniques

De nombreuses études ont été menées pour tenter d'étudier la relation entre l'exposition aux fumées de soudage et la bronchite chronique (caractérisée par une production excessive de mucus dans les voies respiratoires inférieures, ainsi que par une inflammation des tissus). La prévalence des fumeurs chez les soudeurs et les bronchites chroniques dues au tabac dans la population générale sont des facteurs à prendre en compte. Un grand nombre d'études a montré l'existence d'un lien entre exposition et bronchite chronique, ainsi qu'une synergie tabac – soudage (Hunnicut et coll., 1964 ; Cabal et coll., 1988 ; Sulotto et coll., 1989 ; Mur et coll., 1985). D'autres études, moins nombreuses (Fogh et coll., 1969 ; Antti-Poika et coll., 1977 ; McMillan et coll., 1984), n'ont pu mettre en évidence le rôle du soudage dans la survenue de la bronchite chronique.

La sévérité mais aussi le type d'exposition jouent un rôle, et la survenue de bronchites est plus élevée chez les soudeurs à l'arc manuel (MMAW) que chez les soudeurs sous gaz inerte (GMAW).

| Pneumoconioses et fibroses

Dès 1936, une pneumopathie avait été signalée chez des soudeurs après environ 15 années d'exposition ; elle était objectivée par de petites opacités pulmonaires à la radiographie (Doig et coll., 1936 ; Enzer et coll., 1938) ; elle fut bientôt connue sous le nom de sidérose et classée dans les pneumoconioses bénignes (Liss, 1996). Les dépôts d'oxydes de fer observés à l'autopsie se trouvaient majoritairement dans les macrophages alvéolaires. Ces pneumoconioses n'étaient généralement pas associées à une symptomatologie respiratoire et étaient réversibles après arrêt de l'exposition (Morgan et coll., 1963, 1989). Toutefois, des cas de dyspnée et de symptômes respiratoires et, plus rarement, de fibroses interstitielles (Funahashi et coll., 1988), associés à des dépôts pulmonaires de fer (Roesler et coll., 1996), ont été rapportés résultant d'expositions massives, en espace confiné, parfois associés à des expositions mixtes (par exemple charbon ou silice).

| Infection respiratoire et immunité

Plusieurs études ont montré une augmentation de la fréquence et de la sévérité des infections respiratoires chez les soudeurs (Howden et coll., 1988). Ainsi, l'inhalation de fumées de soudage aggrave sérieusement le pronostic de pneumonie (affection bactérienne), avec un taux de mortalité légèrement supérieur chez les soudeurs. Il est possible que les soudeurs soient plus sensibles à l'infection en raison d'un effet immunosuppresseur des fumées ; une déficience en cellules immunocompétentes a d'ailleurs été observée dans cette population professionnelle (Boshnakova et coll., 1989).

| Cancer du poumon

De nombreuses études épidémiologiques ont été menées pour étudier l'existence d'un lien éventuel entre exposition aux fumées de soudage et cancer du poumon. En 1990, le CIRC a passé en revue 23 études épidémiologiques (études de cohortes et cas-témoin) et a conclu à *une preuve limitée* d'un effet cancérigène des fumées et gaz de soudage. Il est difficile d'interpréter les excès de cancers pulmonaires observés chez les soudeurs, en raison du manque de mesures précises de l'exposition et de la présence de facteurs de confusion tels que le tabagisme et l'exposition à l'amiante (Hansen et coll., 1996). Le problème se complique du fait d'un nombre plus élevé de fumeurs chez les soudeurs que dans la population générale (Streling et coll., 1976 ; Dunn et coll., 1960 ; Menck et coll., 1976). Il semblerait que le soudage sous acier doux, qui représente environ 90 % du soudage, ne soit pas en cause, mais que le risque soit limité au soudage de l'acier inoxydable, pour lequel chrome et nickel sont présents dans les fumées à des taux non négligeables.

Plusieurs études, réalisées après cette expertise, ont montré que les ouvriers exposés aux fumées de soudage présentaient un risque plus élevé de développer un cancer du poumon, par rapport à d'autres ouvriers ou à la population générale. Cependant, il n'est pas possible de quantifier ce risque ni d'établir dans quelle mesure l'amiante et le tabac participent à cette augmentation (Palmer et coll., 2001). Pour certains auteurs, le risque est limité au soudage sur acier inox, dont les fumées contiennent des cancérigènes reconnus, comme le chrome et le nickel, en quantités non négligeables.

Les études concernant le soudage sur acier doux donnent des résultats divergents : en 1993, Moulin et coll. et Danielson et coll. observent, respectivement dans des usines françaises et norvégiennes, une augmentation du risque du cancer du poumon chez des soudeurs, alors que Steenland et coll. (1991) n'observent aucune augmentation de risque sur une cohorte de 4 459 soudeurs qui n'étaient exposés ni à l'amiante ni au soudage acier inox.

Plusieurs études ont été réanalysées afin de tenter d'éliminer les facteurs confondants. L'ensemble des résultats semble montrer que l'exposition aux fumées de soudage augmente le risque de cancer du poumon (Sjogren et coll., 1994 ; Langard., 1993-1994 ; Moulin et coll., 1997 ; Becker., 1999 ; Danielsen., 2000 ; Ambroise et coll., 2006) ; toutefois, il serait intéressant d'évaluer en détail l'ensemble des études parues après 1990, pour statuer sur l'existence ou non d'une relation de cause à effet.

Des études sur lymphocytes de soudeurs ont montré une augmentation de la formation de ponts ADN-protéines. Cette modification de l'ADN aurait un rôle prépondérant dans l'initiation et la promotion de cancers (Costa, 1991, 1993)

4.1.2. Effets sur les autres systèmes

| Effets cutanés et hypersensibilité

Hormis les facteurs physiques (par exemple, les radiations ultraviolettes émises au cours du soudage, qui pourraient jouer un rôle non négligeable dans les pathologies cutanées), plusieurs substances chimiques (dérivés du nickel, chrome, zinc, cobalt, cadmium, molybdène, tungstène) émises durant le soudage sont susceptibles de provoquer des phénomènes d'irritation ou de sensibilisation. Des cas d'hyperpigmentation persistant plusieurs années après cessation de l'exposition ont été observés chez des soudeurs. Des eczémas de contact dus au nickel ont également été rapportés.

| Effet sur le système nerveux central

Certains constituants des fumées de soudage, comme le plomb, l'aluminium ou le manganèse, ont été soupçonnés de provoquer des troubles mentaux. S'il a été clairement établi que l'inhalation massive de manganèse pouvait entraîner des troubles neurologiques, il n'a pas été possible de montrer que des fumées de soudage en contenant produisaient le même type d'effets.

| Effet sur la reproduction

Dès 1973, des études ont été menées afin d'évaluer la fonction de reproduction chez les soudeurs ; il n'a pas été démontré que l'exposition aux fumées de soudage affectait la fonction de reproduction chez le mâle. En revanche, l'exposition au soudage sur acier doux, et plus particulièrement sur acier inox, altérerait la qualité du sperme. Le rôle du manganèse a été évoqué, mais d'autres métaux, tels que plomb et cadmium, connus pour leurs propriétés reprotoxiques, pourraient être également impliqués.

4.2. Données expérimentales

| Cytotoxicité

Les fumées de soudage exercent une action cytotoxique sur des macrophages de rat exposés *in vitro*, le degré de toxicité variant avec le mode de soudage : les fumées générées par le soudage manuel, plus solubles, sont plus toxiques que celles produites sous gaz inerte. Le Cr^{VI} serait responsable de la plus forte toxicité des électrodes en acier inox, composées d'environ 20 % de chrome, comparée à celles en acier doux, essentiellement à base de fer (Antonini et coll., 1997 ; 1999).

| Génotoxicité - Mutagénicité

De nombreuses études ont porté sur les fumées de soudage mais également sur leurs constituants. Les fumées de soudage sur acier inox ont montré une nette activité mutagène sur *Salmonella typhimurium* (Hedenstedt et coll., 1977 ; Maxild et coll., 1978). Contrairement à celles produites par l'acier doux, ces mêmes fumées générées lors du soudage manuel ont des effets toxiques et transformants sur cellules BHK (cellules rénales de hamster nouveau-nés ; Hansen et coll., 1985). Ici encore, ces effets sont attribués au Cr^{VI} , mais d'autres composés sont susceptibles de jouer un rôle et, selon Biggart et coll. (1987), les fumées de soudage sur acier doux, dépourvues de Cr^{VI} , contiendraient des agents mutagènes et/ou promutagènes insolubles dans l'eau.

Hansen et Stern (1983) ont montré que tous les dérivés du nickel testés, y compris le sous-sulfure de nickel, cancérigène reconnu pour l'homme, avaient un pouvoir transformant identique, indépendant de l'origine du nickel.

| Inflammation pulmonaire, lésion et fibrose

De nombreuses études visant à évaluer la toxicité pulmonaire aiguë des fumées de soudage ont été menées par instillations intratrachéales.

White et coll. (1981) ont comparé les fumées générées par l'acier doux ou inox, ces dernières étant plus toxiques. Ces mêmes auteurs démontrent un an plus tard que la toxicité est due essentiellement à la teneur en Cr^{VI} soluble.

Hicks et coll. (1984) montrent que l'administration de doses massives (10 ou 50 mg/rat) entraîne des dépôts répartis dans les alvéoles et les conduits alvéolaires, où se forment une accumulation de macrophages ; toutefois, là encore, les particules issues de fumées de métal doux s'éliminent plus efficacement que celles issues de l'acier inox, qui forment des agrégats. Avec les deux types de fumées on peut, après 200 à 300 jours,

observer une fibrose. Il faut toutefois souligner que cette pathologie a été obtenue suite à une administration massive non représentative de la réalité industrielle, et probablement due à une surcharge pulmonaire. Le rat est l'espèce la plus sensible à ce type d'effet (Antonini et coll., 1996, 1997). Il est clair que, selon le procédé de soudage et le type d'électrodes utilisé, les réponses pulmonaires et la vitesse d'épuration sont différentes. La présence de cytokines (TNF- α et IL-1 β) dans les poumons de rats exposés à des fumées générées par l'acier inox pourrait expliquer les phénomènes inflammatoires observés. Il est également intéressant de souligner que les fumées fraîchement formées sont plus agressives, sans doute en raison d'une concentration plus élevée de radicaux libres à la surface des particules.

Plusieurs études ont été menées par inhalation chez le rongeur, ce qui reflète mieux la réalité que la voie intratrachéale et permet d'apprécier l'effet irritant. Lors d'expositions uniques allant de une à quatre heures (Hewitt et coll., 1973 ; Uemitsu et coll., 1984), des signes histopathologiques d'irritation pulmonaire apparaissaient lors de soudage sur acier inox pour de fortes concentrations (0,6 mg/m³ ou 1 g/m³ pendant 6 h ou 1 h respectivement) ; des dépôts de mucus dans les alvéoles et une hyperplasie des cellules à mucus dans l'épithélium bronchique sont observés. Les particules se déposent au niveau des bronchioles respiratoires et des macrophages chargés de particules se déposent au niveau des bifurcations (Yu et coll., 2000). L'exposition répétée (2 h/j pendant 90 jours) entraîne, à forte concentration (environ 0,1 g/m³), des signes précurseurs de fibrose au jour 15, avec installation d'une fibrose au jour 60, alors qu'à 57-67 mg/m³, aucun signe de fibrose n'est observé (Yu et coll., 2001).

| Dépôt pulmonaire, dissolution, élimination

Plusieurs études chez l'animal ont permis d'apprécier le devenir des fumées de soudage dans le poumon. Leur élimination se fait en trois phases :

- la phase I représente la clairance mucociliaire des particules, transportées dans le tractus gastro-intestinal et éliminées rapidement (temps de demi-vie inférieur à un jour) par les fèces ;
- la phase II est un processus plus lent (temps de demi-vie d'une semaine) : les particules sont phagocytées telles quelles par les macrophages pulmonaires ;
- au cours de la phase III, la plus longue, la vitesse d'élimination varie avec la solubilité de chaque élément.

La microanalyse quantitative par rayons X (Antilla, 1986) a permis de montrer, dans le cas du soudage manuel avec électrodes en acier inox, qu'une population secondaire de particules n'était pas solubilisée 3 mois après l'exposition ; dans le cas du soudage à l'arc, c'est l'ensemble des particules qui reste insoluble.

| Cancer du poumon

Deux études par voie intra-trachéale, une chez le rat (Migai et coll., 1965), l'autre chez le hamster (Reuzel et coll., 1985), ainsi qu'une étude d'implant dans les bronches chez le rat (Berg et coll., 1987), donnent des résultats négatifs, mais aucune conclusion n'a pu en être tirée en raison du manque de fiabilité de ces essais.

| Fonction pulmonaire

Aucune étude sur animal n'est disponible.

| Immunotoxicité

Les études concernant l'exploration du système immunitaire sont limitées. L'effet des chromates solubles, connus pour activer les macrophages et favoriser la production d'IL-1 β et IL-6 et de TNF- α , a été étudié en présence d'ozone en vue de simuler l'exposition aux fumées de soudage. Aucune modification n'a été observée, ce qui indique que ces effets sont dus aux particules et dépendent de leur solubilité (Cohen et coll., 1998).

Yamamoto et coll. (2001) ont montré que l'inhalation de fluorures, composant classique des électrodes à flux, diminue les mécanismes de défenses vis-à-vis de bactéries (staphylocoque doré) ; l'élimination des bactéries (*Listeria monocytogenes*) est également freinée par l'instillation intratrachéale de fumées de soudage. Ici encore, les fumées les plus solubles sont les plus actives (Antonini et coll., 2001).

| Hypersensibilité cutanée

Les fumées de soudage sont susceptibles d'entraîner des réactions d'hypersensibilité cutanée dont la fréquence varie avec le type de soudage. Cet effet est généralement attribué aux sels de chrome.

| Effets sur le système nerveux central

Le composant le plus susceptible d'engendrer ce type d'effets est le manganèse. Ce métal, surtout présent lors du soudage sous électrodes en acier doux, est connu pour ses propriétés neurotoxiques et serait responsable d'un syndrome neurologique de type parkinsonien (Cooper, 1984). Le bioxyde de manganèse est d'ailleurs inscrit au tableau 39 des maladies professionnelles. Chandra et coll. (1981) et Sjogren et coll. (1996) ont même émis l'hypothèse que ce métal favoriserait l'apparition précoce d'une pathologie de type Parkinson. Chez le rongeur, il a été montré (Fishman et coll., 1985 ;

Aschner et coll., 1994, 1999) que le manganèse di- ou tri-valent traversait la barrière hémato-encéphalique par l'intermédiaire de la transferrine, transporteur du fer (voir chapitre 3, point 4.1) ; il reste qu'en présence de fer, composant majeur des fumées de soudage, la compétition joue en faveur de ce dernier et peut grandement modifier l'effet neurotoxique des fumées de soudage potentiellement induit par le manganèse. Gianutsos et coll. (1997) et Brenneman et coll. (2000) ont aussi montré l'existence chez le rongeur d'un transport direct du nez vers les structures cérébrales le long des neurones olfactifs, en court-circuitant la circulation sanguine. Ce mécanisme est cependant difficilement transposable à l'homme en raison de différences anatomiques et physiologiques importantes avec le rongeur : dans le système nerveux central, le bulbe olfactif occupe une place beaucoup plus importante chez le rongeur que chez l'homme, et le rongeur, contrairement à l'homme, respire obligatoirement par le nez. Enfin, une étude (Hudson et coll., 2001) a montré que des extraits de fumées de soudage favorisaient l'oxydation de la dopamine et inhibaient la peroxidation des lipides du cerveau ; cependant, l'intensité de la réponse est influencée par d'autres paramètres que la composition chimique, montrant qu'une évaluation correcte des dangers ne peut être que globale.

| Effets sur la fertilité et la reproduction

Deux études, menées en 1966 par Dabrowski, ont montré des effets sur la fertilité mâle et femelle, avec atteinte sévère des organes de la reproduction après exposition répétée (32, 82 ou 102 jours) à la concentration de 222 mg/m³, 3 h par jour. Ces résultats sont incomplets car la toxicité générale, donnée indispensable à l'interprétation de ce type d'études, n'est pas rapportée. On peut cependant noter que des effets sévères sont observés à un niveau de concentration considéré comme modéré en expérimentation animale ; de plus, la présence de dérivés du cadmium ou du chrome, substances reprotoxiques, rend plausibles ces observations. Des expérimentations plus précises, complétées par des études sur le développement, seraient utiles pour apprécier correctement ces effets.

Note. Cette valeur de concentration est très supérieure à celle préconisée par l'ACGIH, soit 5 mg/m³ pour une période de travail de 8 heures, mais elle peut être largement dépassée, notamment en atmosphère confinée.

Discussion

Des particules ultra-fines ont été identifiées dans les fumées de soudage (Clapp et Owen, 1977), qui s'agrègent et s'agglomèrent partiellement. L'existence de particules insolubles a également été montrée chez le rat notamment lors du soudage sur acier inox ; elles persistent au moins trois mois après l'arrêt de l'inhalation.

Ces différents éléments permettent d'émettre l'hypothèse d'une implication des PUF dans la toxicité des fumées de soudage ; il est toutefois difficile de définir leur part de responsabilité effective. Sont-elles responsables d'effets spécifiques, agissent-elles associées à des éléments toxiques plus solubles ? Ont-elles des effets plus subtils non identifiés au cours de ces explorations classiques ? Des travaux complémentaires seraient nécessaires pour améliorer nos connaissances dans ce domaine.

Des informations sur la toxicologie des PUF (Geiser et coll., 2005) montrent leur influence sur la physiologie pulmonaire (Pietropaoli et coll., 2004) et notent des effets pneumotoxiques plus sévères avec ce type de particules qu'avec des particules de même composition mais de taille plus importante (Ferin et coll., 1992 ; Oberdörster, 1992). Il s'avère également que, contrairement aux particules de plus gros diamètre qui sont éliminées par expectoration, transport mucociliaire ou encore phagocytées par les macrophages, les PUF traversent rapidement la membrane pulmonaire (Brown et coll. 2002 ; Kreyling et coll., 2002). De plus, l'existence d'un transport à travers l'épithélium olfactif entraînant une accumulation dans le cerveau a été montrée pour différents types de PUF (Oberdörster, 2004)

Des perturbations du système nerveux autonome ainsi qu'une action directe sur les cellules avec induction de mutations ont été décrites (Harder et coll. 2005 ; Samet et coll., 2004).

Des expériences menées *in vitro* ont montré la pénétration de PUF dans les mitochondries de macrophages et de cellules épithéliales donnant lieu à un phénomène de stress oxydatif et à des lésions des mitochondries (Li et al. 2003)

Concernant la pénétration percutanée de nanoparticules, se reporter au chapitre 3, point 3 pour une étude détaillée.

À la lumière de ces données, on peut émettre l'hypothèse que les PUF jouent un rôle dans un certain nombre d'effets observés lors de l'inhalation de fumées de soudage et en premier lieu sur le système respiratoire, organe cible majeur : la fièvre des métaux due aux oxydes métalliques (zinc, cuivre, magnésium, cadmium), la bronchopneumopathie chronique, et peut-être le cancer du poumon, dont la responsabilité serait attribuée au chrome et au nickel. Rappelons qu'en 1990 le CIRC considérait que « les fumées de soudage sont peut-être cancérogènes pour l'homme » en raison de preuves limitées chez l'homme, et insuffisantes chez l'animal en raison de la mauvaise qualité des études (groupe 2B).

Depuis 1990, des études ont montré que les PUF peuvent entraîner des dommages oxydatifs sur l'ADN (Vinzents et coll., 2005), accompagnés d'effets mutagènes. Ces données pourraient venir étayer l'hypothèse d'un effet cancérogène qui est, dans l'état actuel des connaissances, du domaine du spéculatif.

Il est également possible que les PUF soient impliquées dans la survenue d'infections respiratoires par action sur les macrophages alvéolaires, et en raison de leur aptitude à

se répartir facilement dans les différents compartiments de l'organisme, atteignant ainsi les cellules du système immunitaire.

Susceptibles également de franchir la barrière cutanée, la barrière hémato-encéphalique ou d'atteindre les organes de la reproduction, les PUF pourraient intervenir dans les effets plus ou moins nets observés sur la peau, le système nerveux central et l'appareil reproducteur. Néanmoins, des travaux complémentaires sont nécessaires pour préciser ces effets et dégager le rôle spécifique des PUF.

Conclusion

Le soudage est une activité professionnelle considérée comme dangereuse car elle allie au risque chimique, seul considéré ici, des risques physiques tels que chaleur, brûlure, radiations, bruit, électrocution, ainsi que des postures de travail inconfortables. Le risque chimique se rapporte aux particules, mais également aux gaz toxiques, qui ne faisaient pas l'objet de cette revue. La nature de ces derniers varie avec la composition des fumées, qui dépend elle-même de la pièce à usiner, de la technique employée et de l'environnement du poste de travail. Les effets observés chez l'homme, chez l'animal, ou encore au niveau cellulaire, affichent une bonne cohérence, avec un effet clair sur le système respiratoire ; toutefois l'effet cancérigène, soupçonné chez l'homme, n'a pu être étayé par des données animales, peu nombreuses et conduites par des voies d'exposition inappropriées.

Les effets sur le système immunitaire tant au niveau respiratoire que cutané semblent admis, même si les études animales sont, ici encore, assez limitées.

L'effet global des fumées de soudage sur le système nerveux central est peu exploré, bien que les effets neurotoxiques potentiels de certains de leurs composés soient reconnus.

Les données relatives aux effets reprotoxiques suggèrent des effets possibles sur la fertilité, mais les informations sont parcellaires et les rapports d'essais mal documentés ; ici encore, la présence de composés connus pour ce type d'effets est à noter.

Alors que le soudage est une activité clé du secteur industriel, ses effets sur les personnes professionnellement exposées sont encore imparfaitement connus et les mécanismes d'action loin d'être identifiés. Des études complémentaires aideraient à préciser le rôle et la toxicité des PUF en fonction des procédés de soudage et permettraient d'adapter au mieux les dispositifs de protection et les mesures de prévention ; elles participeraient également à une meilleure connaissance des dangers potentiels de PUF issues de nouvelles technologies.

Bibliographie

- Antonini JM (2003). Health effects of welding. *Crit Rev Toxicol* **33**(1) 61-103.
- Antonini JM, Lewis AB, Roberts JR, Whaley DA (2003). Pulmonary effects of welding fumes: review of worker and experimental animal studies. *Am J Ind Med* **43**(4) 350-360.
- Antonini JM, Taylor MD, Zimmer AT, Roberts JR (2004). Pulmonary responses to welding fumes: role of metal constituents. *Toxicol Environ Health A* **67**(3) 233-249.
- BG (1996). Hazardous substances in welding and allied processes. Arbeitsgemeinschaft der Metall-Berufsgenossenschaften.
- Borska L, Fiala Z, Smejkalova J, Tejral J (2003). Health risk of occupational exposure in welding processes I. Genotoxic risk. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **46**(1) 25-29.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* **113**(11) 1555-1560.
- Lähde T, Hämeri K, Kasurinen H, Koskinen A, Ukkonen A (2004). Welding Fume Number Concentrations – Laboratory Measurements. In: *Nanomaterials: a risk to health at work?* 1st International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials, 12-14 October 2004, Buxton, UK, page 119.
- Meo SA, Al-Khlaiwi T (2003). Health hazards of welding fumes. *Saudi Med J* **24**(11) 1176-1182.
- NIOSH: http://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/nano_exchange_health.html
- Stephenson D, Seshadri G, Veranth JM (2003). Workplace exposure to submicron particulate mass and number concentrations from manual arc welding of carbon steel. *Am Ind Hyg Assoc J* **64**(4), 516-521.
- Vinzents PS, Möller P, Sorensen M, Knudsen LE, Hertel O, Jensen FP, Schibye B, Loft S (2005). Personal exposure to ultrafine particles and oxidative DNA damage. *Env Health Perspect* **113**(11) 1485-1490.
- Voitkevich VG (1992). Propriétés physiques et chimiques des fumées de soudage en relation avec leur toxicité. *Soudage et techniques connexes* **46**(3-4) 54-64.
- Wehner B, Wiedensohler A, Koziar C, Weise D, Gartzke J (2001). Propriétés des aérosols présents dans l'environnement des postes de soudage d'un chantier naval en fonction de la taille des particules. Colloque international AISS *Poussières, fumées, brouillards sur les lieux de travail*, Toulouse, juin 2001.
- Zimmer AT (2002). The influence of metallurgy on the formation of welding aerosols. *J Environ Monit* **4**(5) 628-632.

Quelques cas concrets (2) : particules à base de carbone

6

1. Toxicité des particules ultra-fines de noirs de carbone (Cas n° 1333-86-4)

F. Roos

1.1. Définition et structure physicochimique

Les noirs de carbone sont des poudres formées de carbone élémentaire (98 à 99,7 %) sous forme de particules primaires quasi sphériques (de 10 à 500 nm) agrégées (d'environ 100 à 800 nm) puis regroupées en agglomérats (environ de 1 à plus de 100 μm). Leurs surfaces spécifiques vont de 10 à 300 m^2/g (Vignes et coll., 1997-1998). Une partie de ces échantillons est donc susceptible de pénétrer jusqu'à l'alvéole, et une fraction des particules peut être qualifiée d'ultra-fines ($< 100 \text{ nm}$, ou $< 0,1 \mu\text{m}$).

Le noir de carbone est souvent confondu avec la suie, mais cette dernière, sous-produit incontrôlé de la combustion incomplète de toutes sortes de matières carbonées (matériaux organiques), présente une composition imprécise et variable ; elle peut contenir notamment plus de 50 % de cendres.

Les différents types de noirs de carbone présentent une large répartition granulométrique, une surface spécifique élevée, une faible proportion de cendres, et des substances pouvant être extraites par du toluène. Le potentiel d'agrégation des noirs de carbone est variable. Un noir de carbone présentant une forte capacité d'agrégation est dit de

structure élevée, la structure étant déterminée par la taille, la forme des particules agglomérées, le nombre de particules par agrégat et leur masse moyenne.

L'unité de base du noir de carbone est l'agrégat, chaîne de particules plus ou moins sphériques ayant fusionné au hasard pour former une structure en branches. Un agrégat peut inclure jusqu'à une centaine de particules sphériques. C'est une structure ouverte, utilisée pour absorber des fluides et renforcer des matériaux comme les caoutchoucs. Les agrégats peuvent être liés entre eux par des forces de Van der Waals et former des agglomérats peu compacts ; ils peuvent, au contraire, être comprimés pour former des billes pouvant atteindre 0,5 cm. La cohésion de ces billes peut être renforcée par des liants (type mélasses – co-produits de la fabrication du sucre de canne et de betterave – et/ou lignosulfonates – dérivés de la lignine issus des procédés de fabrication de la pâte à papier avec du bisulfite).

Pour décrire un agrégat de noir de carbone, deux dimensions sont nécessaires :

- le diamètre moyen des composants sphériques de la chaîne (« épaisseur » de la chaîne). Cette dimension est encore appelée la taille primaire de la particule, elle est généralement inversement proportionnelle à la surface du noir de carbone ;
- l'importance de la ramification des agrégats, liée à leur taille.

La capacité d'absorption interne de fluides par le noir de carbone peut être mesurée par l'absorption de phtalate de dibutyle (exprimée en ml/100 g).

Le comportement du noir de carbone dans l'air et son dépôt dans le tractus respiratoire sont déterminés par le diamètre aérodynamique des particules (voir les chapitres 2 et 3).

1.2. Production

(Vignes et coll., 1997-1998 ; syndicat des fabricants de noir de carbone ; IARC, 1996)

La capacité annuelle mondiale était de 6,7 millions de tonnes, dont 1,3 million pour l'Union européenne en 1995. La production annuelle en France en 1995 était de 275 000 tonnes, pour environ 550 salariés. En 2005, cette production est passée à 295 000 tonnes (trois unités de production), pour une production mondiale d'environ 10 millions de tonnes.

Il existe de nombreuses qualités de noir de carbone, en fonction des matières premières utilisées, des conditions de combustion et de décomposition thermique. Parmi les plus courants figurent :

- le noir de fumée (*lamp black*) : initialement produit en Chine par combustion incomplète dans des lampes à huile et destiné à fournir le pigment de l'encre de Chine, c'est en 1912 qu'il montra fortuitement ses qualités exceptionnelles de renforcement des pneumatiques ;

- le « noir tunnel » (*channel black*) produit à partir de gaz naturel vers la fin du XIX^e siècle. Il représente la forme la plus commercialisée au début du XX^e siècle pour le caoutchouc et les pigments (sa production est actuellement interrompue, sauf en Allemagne). Ses particularités sont une granulométrie très fine (< 30 nm), un faible degré d'agrégation, un taux relativement élevé de complexes oxygénés en surface, un pH acide et un taux relativement élevé de substances volatiles (environ 5 %) ;
- le « noir d'acétylène » est l'un des noirs de carbone le plus pur et possédant un caractère conducteur marqué. Il est obtenu par craquage de l'acétylène à des températures de plus de 2 000 °C. Il présente un faible taux d'oxygène et une très forte agrégation ;
- le « noir de fourneau », produit principalement par combustion incomplète de gaz naturels ou de résidus pétroliers lourds, est la forme la plus commercialisée (95 % de la production) ;
- le « noir thermique » obtenu par chauffage à 1 300 °C d'une chambre réfractaire suivi d'une injection de gaz naturel qui génère la formation de carbone et d'hydrogène. C'est celui qui présente les particules les moins fines et la surface spécifique la plus faible. Il représente 2 % de la production aux États-Unis, Europe de l'Ouest et Japon.

1.3. Propriétés chimiques et physiques

Toutes les différentes formes commercialisées sont insolubles dans l'eau et les solvants organiques. Le tableau suivant (tableau 6.I) présente les propriétés physicochimiques de 4 types de noirs de carbone.

La grande diversité des noirs de carbone peut entraîner des comportements différents, tant en termes de dépôt dans le tractus respiratoire que de retentissement toxique potentiel.

Les impuretés

En raison des matières premières utilisées, de leur mode de production, de leur surface spécifique et de leurs propriétés de surface, les noirs de carbone contiennent un certains nombres de substances adsorbées, dont des composés aromatiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques et leurs composés nitrés et soufrés).

Des traces de composés inorganiques peuvent également être présentes (calcium, fer, potassium, plomb, arsenic, chrome, sélénium).

	Noir d'acétylène	Noir de fourneau	Noir de lampe	Noir thermique
Diamètre moyen des agrégats (nm)	NR	80-500	NR	300-810
Diamètre moyen des particules (nm)	35-50	17-70	50-100	150-500
Surface spéci- fique (m ² /g)	60-70	20-200	20-95 ^(a) 17-25 ^(b)	6-15
Absorption d'huile (ml/g)	3-3,5	0,67-1,95	1,05-1,65	0,3-0,46
pH	5-7	5-9,5	3-7	7-8
Matières volatiles (%)	0,4	0,3-2,8	0,4-9 ^(a) 0,5-1,5 ^(b)	0,1-0,5
Hydrogène (%)	0,05-0,10	0,45-0,71	NR	0,3-0,5
Oxygène (%)	0,10-0,15	0,19-1,2	NR	0-0,12
Extractible dans le benzène (%)	0,1	0,01-0,18	0-1,4	0,02-1,7
Cendres (%)	0	0,1-1	0-0,16	0,02-0,38
Soufre (%)	0,02	0,05-1,5	NR	0-0,25
Densité (g/ml)	NR	1,80	1,77 ^(a)	NR
Exemples d'utilisations	Batteries sèches (piles électriques salines) Isolant ther- mique Ossature de câbles Semelles et tuyaux flexi- bles	Industrie du caoutchouc (pneus...) Encres Plastiques Peintures	Charge pour caoutchoucs Pigments pour cosmétiques, verniss, encres, laques, peintures et plastiques Peinture pour aquarelles Tableaux noirs, ciments, crayons, cuirs Arcs à charbons et résistances	Caoutchoucs industriels : charge dans polymères, élastomères (néoprènes, nitriles et éthylène- propylène)

Tableau 6.I. Propriétés physicochimiques de quatre types de pigments de noir de carbone. Adapté de IARC (1996) et de Vignes et coll. (1997-1998).

NR : non rapporté ; ^(a) valeurs aux États-Unis ; ^(b) valeurs en Europe.

Principaux secteurs d'utilisation dans le monde en 1995

Ces données sont toujours d'actualité.

- Additif et agent de coloration dans les caoutchoucs et plastiques : charge organique modifiant les propriétés physiques, électriques et mécaniques des résines (90 % de la production aux États-Unis).
- La production la plus importante concerne l'industrie des pneumatiques : 70 % (le noir de carbone représente environ 25 % de la masse d'un pneu).
- Autres caoutchoucs pour automobiles : 10 %.
- Caoutchoucs industriels : 10 %.
- Plastiques : 4,5 %.
- Pigments pour peintures, plastiques, papiers, ciments, encres et céramiques.
- Additif dans les vernis à ongles.
- Encres d'impression : 3,5 %.
- Peintures et émail.
- Baguettes de soudage.
- Papier carbone.
- Finition du cuir.
- Agent de filtration.
- Conducteurs d'électricité et piles sèches.
- Raffinage du pétrole : le coke (carbone presque pur) est présent en résidu des opérations de cracking.

1.4. Niveaux d'exposition atmosphérique en milieux de travail

L'homme serait principalement exposé à des agrégats et des agglomérats de noir de carbone (IARC, 2006). Les plus fortes expositions sont observées dans les secteurs professionnels interagissant avec la production (ajusteurs-soudeurs, emballeurs, agents de nettoyage). Les expositions sont très variables dans les chaînes de production et d'un site géographique à l'autre ; les améliorations techniques et préventives ont conduit à leur diminution progressive. Les concentrations (fraction inhalable) sont passées de 1 000 mg/m³ dans les années 1960 à moins de 1 mg/m³ au début des années 1990. Vers la fin des années 1990, les concentrations en fraction alvéolaire étaient inférieures à 0,5 mg/m³. Des niveaux d'exposition moindres ont été observés chez les travailleurs utilisant des noirs de carbone dans la fabrication de matériaux en caoutchouc, d'encres d'imprimerie et de peintures.

L'évaluation des niveaux d'exposition dans les industries utilisatrices est difficile en raison de l'absence de données et en raison de coexpositions à d'autres particules. Il est supposé que ces niveaux y sont moindres, sauf naturellement pour les travailleurs manipulant directement de grandes quantités de noir de carbone. Les experts de l'IARC (2006) considèrent que l'utilisation de matériaux où le noir de carbone est inclus dans une matrice, comme le caoutchouc, les encres ou les peintures, n'entraîne vraisemblablement pas d'exposition significative. Des vérifications métrologiques seraient néanmoins souhaitables.

Valeur limite d'exposition professionnelle

En France, il n'existe pas de valeur limite réglementaire ; il existe néanmoins, depuis 1993, une valeur limite de moyenne d'exposition (VME de 3,5 mg/m³) équivalente à celle retenue par l'ACGIH. Il n'existe pas de valeur correspondante en Allemagne.

1.5. Propriétés toxicologiques des noirs de carbone

Cette partie résume les données toxicologiques générales des noirs de carbone. La partie suivante (1.6), plus détaillée, concerne plus spécifiquement les études consacrées aux PUF de noir de carbone.

Les noirs de carbone ont été classés en 2B par l'IARC en 1996 (cancérogènes possibles pour l'homme), sur la base de données insuffisantes chez l'homme et de données suffisantes chez l'animal. Une réévaluation (IARC, 2006), conduite en raison de la publication de données épidémiologiques et sur des fractions ultra-fines de noirs de carbone, a confirmé cette classification.

Les données présentées ici sont principalement issues du résumé de l'évaluation de l'IARC (février 2006), disponible sur Internet, la version finale du rapport n'étant pas alors publiée.

1.5.1. Données épidémiologiques chez l'homme

Des études épidémiologiques ont été réalisées dans le secteur de la production, où les plus forts niveaux d'exposition ont été observés, pour étudier le potentiel cancérogène des noirs de carbone. Des études de cohorte ont ainsi été menées, l'une aux États-Unis (Ingalls, 1950 ; Ingalls et Risquez-Iribarren, 1961 ; Robertson et Ingalls, 1980, 1989 ; Robertson et Inman, 1996), l'autre en Grande-Bretagne (Hodgson et Jones, 1985). L'interprétation de l'étude américaine est entachée d'incertitudes méthodologiques, alors que le suivi à long terme de la cohorte anglaise semble plus complet. L'étude

américaine, conduite sur dix-huit sites de production, n'a pas retrouvé d'excès de mortalité par cancer. Des déficits ont même été observés pour certains cancers par rapport aux taux attendus. Le tabagisme n'a pas été pris en compte et aucune analyse n'a été réalisée en fonction de l'intensité et des niveaux cumulés d'exposition. L'étude anglaise a montré un excès non statistiquement significatif de décès par cancers respiratoires (SMR : 1,5 ; IC 95% : 1,0-2,2). Une actualisation des données n'a pas permis d'établir de lien entre exposition cumulée et excès de cancers pulmonaires (Sorahan et coll., 2001). Une étude cas-témoin au sein de la cohorte américaine (Robertson et Ingalls, 1989) a porté sur un effectif très réduit et est d'interprétation difficile. La plupart des cas étaient des cancers de la peau (autres que des mélanomes) ; aucun lien n'a pu être mis en évidence avec l'exposition cumulée.

Une nouvelle évaluation des données épidémiologiques (IARC, 2006) montre, dans les cohortes du secteur de la production en Grande-Bretagne et en Allemagne, un excès de risque de cancers bronchopulmonaires comparé aux taux attendus nationaux ; des facteurs de confusion, notamment le tabagisme, ne peuvent être exclus, bien que n'expliquant vraisemblablement pas la totalité de l'excès de risque observé. Il n'a pas été trouvé d'autres pathologies usuellement liées au tabagisme. Des analyses complémentaires portant sur les niveaux d'exposition dans chacune de ces cohortes ont montré des résultats équivoques. Il n'a été observé aucun excès de risque de cancers d'autres localisations.

Des études épidémiologiques ont été effectuées dans des industries utilisatrices de noirs de carbone. Une étude de cohorte a été réalisée aux États-Unis pour évaluer les risques induits par des expositions au formaldéhyde dans dix usines (Blair et coll. 1990). Afin de contrôler les facteurs de confusion et les effets induits par d'autres nuisances, les expositions à d'autres agents chimiques, dont les noirs de carbone, ont été recherchées. Une légère augmentation, non significative, de cancers pulmonaires a été trouvée chez les personnes exposées aux noirs de carbone, sans relation claire avec la durée d'exposition. Ces personnes avaient pu être coexposées au formaldéhyde ou à d'autres nuisances.

Une étude cas-témoins dans une usine de fabrication de pneus et caoutchoucs a recherché une association entre carcinomes épidermoïdes cutanés et fabrication de matériaux en caoutchouc présumés contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Bourguet et coll., 1987). L'exposition à cinq autres substances, dont les noirs de carbone, a été recherchée. Cette étude n'a pas montré d'effet des noirs de carbone sur la survenue des cancers de la peau.

Une étude réalisée en Allemagne chez des ouvriers du caoutchouc a montré un excès de risque de cancers pulmonaires et de cancers de l'estomac, excès qui disparaissait après ajustement sur les expositions au talc, aux nitrosamines et à l'amiante (IARC, 2006). Quelques résultats isolés suggèrent l'existence d'excès de risque de cancers de

la vessie, du rein, de l'estomac et de l'œsophage, mais ces données ont été considérées comme insuffisantes.

Une étude réalisée sur des dockers italiens ayant manipulé notamment des sacs de noir de carbone a montré des cas de mésothéliomes et de mélanomes qui *a priori* ne sont pas liés à ces opérations. Parmi les autres localisations de cancers, seul un excès statistiquement significatif de cancers de la vessie a été observé (étude citée par l'IARC, 2006).

Une étude cas-témoins canadienne n'a pas retrouvé d'excès des cancers suivants en relation avec des expositions professionnelles aux noirs de carbone : estomac, côlon, rectum, pancréas, prostate, vessie, mélanome et lymphome non hodgkinien. D'autres cancers en excès semblaient en relation avec ces expositions professionnelles élevées au noir de carbone : œsophage, reins et carcinomes pulmonaires à petites cellules (Siemiatycki, 1991).

Une étude cas-témoins suédoise rapporte un excès non significatif de cancers urothéliaux chez les hommes exposés aux noirs de carbone (Steineck et coll., 1990).

Sur la base de ces données, l'IARC (2006) a conclu que les données sont insuffisantes pour établir la cancérogénicité des noirs de carbone pour l'homme.

1.5.2. Chez l'animal (IARC, 1996 et 2006)

Des excès de cancers pulmonaires sont induits chez les rongeurs exposés par inhalation.

Il n'existe pas d'études « adéquates » disponibles pour évaluer la cancérogénicité chez l'animal par voie orale des noirs de carbone.

Une étude réalisée chez des souris femelles exposées par inhalation n'a pas montré d'augmentation de l'incidence des cancers du tractus respiratoire.

Deux sortes de noirs de carbone ont été utilisées pour réaliser deux études par inhalation chez des rats femelles, et une étude chez des rats des deux sexes. Une augmentation significative de l'incidence des tumeurs malignes et bénignes pulmonaires a été observée chez les rats femelles dans ces trois études. Il a été également observé une augmentation d'incidence de tumeurs bénignes kystiques et de kystes épidermoïdes kératinisants.

Trois études ont été conduites par administration intratrachéale de noirs de carbone à des rats femelles : la première a utilisé deux types de noirs de carbone, la deuxième des extraits au toluène de deux types de noirs de carbone, la troisième un type de noir de carbone. Chacune a montré une augmentation de l'incidence de tumeurs pulmonaires bénignes et malignes. L'une des études, réalisée avec un noir de carbone présentant des particules plus grosses, a montré une augmentation de tumeurs kystiques kératinisantes.

Plusieurs études réalisées chez la souris par voie cutanée, avec différents types de noirs de carbone, n'ont pas montré d'excès de cancers cutanés ; en revanche, l'application cutanée de divers extraits benzéniques a induit des tumeurs.

Plusieurs études par injection sous-cutanée, à des souris des deux sexes, de noirs de carbone contenant des hydrocarbures aromatiques polycycliques ont mis en évidence la survenue de sarcomes ; l'injection de noir de carbone pur n'entraînait aucun sarcome. L'injection sous-cutanée d'extraits au solvant de noirs de carbone induisait également des sarcomes.

Les données expérimentales par différentes voies d'administration chez les rongeurs (rats et/ou souris) sont considérées par l'IARC (2006) comme suffisantes pour affirmer le potentiel cancérigène pour l'animal des noirs de carbone et de leurs extraits par solvant. Ces données paraissent suffisantes pour justifier la classification *Cancérogène de catégorie 3* et l'étiquetage *Nocif R40* (effet cancérigène suspecté - preuves insuffisantes).

Néanmoins, les poussières de noir de carbone ne sont pas soumises actuellement à un étiquetage réglementaire européen.

1.5.3. Autres données toxicologiques

Des études chez l'homme ont confirmé le dépôt des noirs de carbone dans le tractus respiratoire ; de légères modifications radiologiques ont été observées. Des bronchites chroniques et une diminution de la fonction respiratoire ont été observées chez des travailleurs exposés. Ces effets peuvent être considérés comme un retentissement irritatif aspécifique. Quelques études suggèrent néanmoins l'existence d'une réaction fibrotique en périphérie des dépôts de noir de carbone.

La surveillance médicale de 935 travailleurs de 11 entreprises de fabrication de noir de carbone en Europe de l'Ouest a retrouvé 6 cas de pneumoconioses simples chez des personnes ayant été exposées plus de 10 ans (catégorie 2 ou moins de la classification du BIT ; Crosbie, 1986). L'étiologie de ces pneumoconioses reste controversée du fait de possibles coexpositions à la silice cristalline au cours de la fabrication.

Concernant le retentissement sur la fonction respiratoire, les résultats des études sont discordants ; certaines ne retrouvent pas de troubles fonctionnels chez des ouvriers de production, hormis ceux attribués à l'âge et au tabac (Crosbie, 1986 ; Robertson et coll. 1988), tandis qu'une étude transversale est en faveur d'une morbidité respiratoire accrue chez les ouvriers de la production (Gardiner et coll., 2001).

Des études de rétention pulmonaire après inhalation ou instillation intratrachéale chez le rongeur ont montré que ces particules se comportaient comme d'autres particules de faible solubilité et de faible toxicité. La surcharge pulmonaire induit une réaction inflammatoire chronique, une prolifération fibroblastique et des dépôts accrus de

collagène. Le hamster présente des capacités de clairance supérieures à celles du rat et de la souris. La surface spécifique élevée des noirs de carbone semble jouer un rôle important dans l'induction des phénomènes inflammatoires et des autres réactions pulmonaires. Les femelles seraient plus sensibles que les mâles, observation couramment retrouvée avec d'autres particules. Les effets observés chez ces différentes espèces de rongeurs sont dose-dépendants et incluent inflammation et atteintes des cellules épithéliales. Les lésions pulmonaires sont plus sévères et plus prolongées chez le rat que chez la souris ou le hamster.

Les études *in vitro* montrent que les particules de noir de carbone donnent naissance à des espèces réactives de l'oxygène dans des systèmes acellulaires, avec augmentation de la production du Tumor Necrosis Factor (TNF- α) et de facteurs activés du complément.

Le potentiel génotoxique des noirs de carbone a été évalué *in vivo* et *in vitro*. Chez des rats exposés par inhalation à du noir de carbone pendant 13 semaines ont été observés une augmentation de mutation du gène HPRT, et des adduits 8-oxo-déoxyguanosine dans les cellules épithéliales pulmonaires. *In vitro*, la catalase inhibe la formation de mutations de HPRT dans les cellules épithéliales pulmonaires de rat préalablement induites par instillation intratrachéale de noir de carbone, ce qui suggère un rôle des facteurs oxydants libérés par ces cellules.

Dans deux études sur les cinq réalisées, le noir de carbone a provoqué la formation d'adduits à l'ADN dans le tissu pulmonaire périphérique de rats exposés par inhalation pendant deux ans.

L'exposition au noir de carbone ne semble pas induire de mutations des gènes K-Ras et p53.

Des études *in vitro* sur cellules de hamster ont montré que les noirs de carbone induisaient des micronoyaux ainsi qu'une transformation cellulaire, sans échanges de chromatides sœurs.

La majorité des tests de mutagenèse sur bactéries sont négatifs (IARC 1996, 2006).

1.6. Toxicité du noir de carbone ultra-fin

1.6.1. Études expérimentales *in vitro*

Stone et coll. (1998) ont montré sur des cultures de cellules épithéliales pulmonaires humaines de type II (A549) que le noir de carbone ultra-fin induisait une cytotoxicité (test au MTT) accrue et différée dans le temps par rapport à du noir de carbone fin (48 heures comparées à 24 heures). L'introduction de mannitol, piègeur de radicaux hydroxyles, réduisait cet effet. Le noir de carbone ultra-fin (diamètre moyen 14,3 nm)

induisait également plus de radicaux libres que le noir de carbone fin (diamètre moyen 260 nm). Dans ces conditions, le noir de carbone ultra-fin est à l'origine d'un stress oxydatif cellulaire plus important que le noir de carbone fin.

La même équipe, dans deux études publiées en 2000, a montré que des PUF de noir de carbone induisaient, sur des lignées de monocytes humains et des cellules issues du liquide de lavage bronchoalvéolaire de rat (> 80 % de macrophages), une augmentation des ions calciques dans le cytosol, cet afflux provenant du passage des ions extracellulaires à travers les canaux calciques de la membrane cellulaire. Le noir de carbone non ultra-fin ne produisait pas ces effets. Ces résultats viennent étayer les mécanismes physiopathologiques de l'effet pro-inflammatoire induit par des PUF, l'afflux d'ions calciques dans le cytosol induisant probablement l'activation de facteurs de transcription spécifiques tels que le NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), à l'origine de l'augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires. Les auteurs ont également montré le rôle inhibiteur de certains antioxydants, ce qui semble indiquer que ces effets sont médiés par des espèces réactives de l'oxygène.

Renwick et coll. (2001) ont étudié la fonction de phagocytose d'une lignée de macrophages alvéolaires de souris après huit heures d'exposition à des particules fines ou ultra-fines de TiO₂ et de noir de carbone. Des microsphères de latex ont été utilisées. Un test de cytotoxicité (MTT) n'a pas montré d'atteinte cytotoxique, quel que soit le type de particules. L'augmentation de la concentration en particules entraîne une réduction de la phagocytose, quel que soit le type de particules. Les résultats observés aux doses faibles sont intéressants car ils montrent que les deux types de PUF (le noir de carbone dans une proportion plus élevée) entraînent une activité de phagocytose plus importante que pour les contrôles ou les fractions fines. En d'autres termes, alors que la pré-exposition à de fortes concentrations de particules, et plus particulièrement de PUF, altère l'activité de phagocytose de ces cellules, la pré-exposition à des concentrations faibles semble au contraire la stimuler. Les résultats suggèrent également que la phagocytose est influencée par un « effet spécifique à la particule » et qu'elle dépend du volume des particules internalisées (Renwick et coll., 2001 ; Hoet et Nemery, 2001).

Le cytosquelette du macrophage alvéolaire lui permet de se déplacer dans les tissus biologiques et de phagocyter les particules. Möller et coll. en 2002 ont étudié l'influence de particules fines et ultra-fines de TiO₂, de PUF de carbone élémentaire ou de noir de carbone, de particules diesels et urbaines sur le cytosquelette de macrophages alvéolaires de chiens et de souris. Dans toutes les expérimentations menées avec les PUF aux doses de 10 à 320 µg de PUF/ml/10⁶ cellules pendant 24 heures (analyses de la phagocytose, des mécanismes de transport des phagosomes, de la prolifération, de la nécrose et de l'apoptose cellulaire), les macrophages de souris étaient plus sensibles. Un retentissement sur le transport des phagosomes et une rigidité cellulaire accrue ont été observés à partir de 100 µg de PUF/ml/10⁶ cellules dans les deux types cellulaires. Les

PUF ont perturbé la phagocytose des MA, ont inhibé leur prolifération et réduit leur viabilité. La comparaison avec les PUF de carbone élémentaire (diamètre 90 nm, surface spécifique 600 m²/g) et les PUF de noir de carbone (diamètre 12 nm et surface spécifique 300 m²/g) ont montré une toxicité plus grande des PUF de carbone élémentaire comparé aux PUF de noir de carbone.

En 2005, ces travaux ont été complétés par une étude sur des macrophages J774A.1 issus d'une lignée de souris BALB/c/NIH. Les cellules ont été exposées à des PUF de carbone élémentaire, de noir de carbone, de diesels et de poussières urbaines. Outre la cytotoxicité, observée essentiellement avec le carbone élémentaire et le noir de carbone, c'est-à-dire avec les particules de surfaces spécifiques les plus élevées, cette étude, comme celle de Stone et coll. (2000), a montré le rôle du calcium intracellulaire dans le dysfonctionnement du cytosquelette. Cet effet était inhibé par le vérapamil (bloquant les canaux calciques) alors que le chélateur de calcium intracellulaire (BAPTA-AM) restait sans effet, ce qui suggère que la concentration cytosolique en calcium n'est pas le seul phénomène impliqué dans ces perturbations (Möller et coll., 2005).

Wilson et coll. (2002) ont évalué les interactions entre des sels métalliques et des PUF de noir de carbone (CBUF) de diamètre environ 14 nm et de surface spécifique 253,9 m²/g. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec du CB de diamètre environ 260 nm et de surface spécifique 7,9 m²/g. Dans tous les systèmes expérimentaux, le CBUF a été plus réactif que le CB. En milieu acellulaire, le CBUF a formé plus d'espèces activées de l'oxygène (EAO) que le CB, à concentration égale (sonde de dichlorofluorescéine). L'adjonction de sulfate de cuivre, de sulfate ferreux ou de chlorure de fer a majoré la libération d'EAO par le CBUF. L'exposition de macrophages alvéolaires humains à du CBUF a généré plus d'EAO que le CB ; l'adjonction de sels de fer n'a pas modifié ces résultats. Le CBUF a entraîné une diminution du taux de GSH et d'ATP dans des macrophages de souris. L'adjonction de sels de fer a majoré cet effet, à la dose la plus élevée. A également été observée une augmentation dose-dépendante de la production de TNF- α , mais l'adjonction de sel de fer n'a pas modifié cet effet. Ces résultats suggèrent que ces PUF et les sels de métaux interagissent dans un environnement acellulaire pour former des espèces réactives de l'oxygène. Cette potentialisation d'induction d'EAO n'est pas observée en présence de macrophages alvéolaires, ce qui pourrait s'expliquer par un effet chélateur du fer par ces cellules.

Timblin et coll. (2002) ont montré que l'exposition de cellules épithéliales alvéolaires issues de rongeurs à du CBUF induisait une augmentation significative d'ARNm codant pour des protooncogènes (*jun* et *fos*) ainsi que l'augmentation significative de gènes codant pour la prolifération et l'apoptose cellulaire. Ces effets étaient absents ou moindres avec des fractions fines. Le CBUF augmentait le nombre de cellules en phase apoptotique ou nécrotique (phase sub-G0/G1). Ces observations étayent les conclusions de certains auteurs (Mossman et Churg, 1998 ; Manning et Patierno, 1996), selon lesquelles la prolifération cellulaire faisant suite à l'atteinte toxique des cellules

épithéliales, ainsi que la balance entre phénomène prolifératif et apoptotique, sont des événements majeurs dans le développement des maladies prolifératives, dont la fibrose pulmonaire et le cancer.

Kim et coll. (2003) ont montré que des particules de CBUF (diamètre moyen 14,3 nm, surface spécifique 254 m²/g) inhibaient la contraction de gels de collagène tridimensionnels par des fibroblastes. Les particules fines (diamètre moyen 260,2 nm et surface spécifique 7,9 m²/g) n'ont pas induit les mêmes effets. Ces observations résultent partiellement de la liaison de facteurs favorisant la contraction (fibronectine et TGF- β) à la surface des PUF et de la diminution probable de la production de fibronectine du fait d'une diminution de son ARNm. Les auteurs ont également vérifié que ces effets n'étaient pas liés à des mécanismes oxydatifs ou cytotoxiques. Le rôle du fer dans les différents échantillons de CB n'est pratiquement pas discuté ; pourtant, l'échantillon de noir de CB ne contenait pas de fer, tandis que celui de CBUF en recelait de faibles concentrations. Cette étude a également mis en évidence un effet inverse à faibles concentrations : le CBUF n'absorbait pas le TGF- β , ne bloquait pas la contraction du gel de collagène et montrait un léger effet stimulant sur la fabrication de fibronectine et l'émission de TGF- β . Ces observations suggèrent que des particules de CBUF contribuent au développement de la fibrose à faibles concentrations, alors qu'elles altèrent la réparation tissulaire à concentrations élevées.

Ramage et Guy (2004) ont montré que les particules PM₁₀ issues de la pollution environnementale et celles de CBUF induisaient une expression accrue de la protéine réactive C (CRP) et de la protéine de la résistance à la chaleur (*Heat-Shock Protein 70*) par des cellules épithéliales pulmonaires humaines (lignée A549). L'ajout d'antioxydants réduisait la quantité de ces protéines, suggérant que l'agression de l'épithélium pulmonaire par ce type de particules entraîne un stress oxydatif à l'origine d'une réponse inflammatoire. Bien que les niveaux de CRP aient été légèrement inférieurs à ceux formés en présence de la fraction PM₁₀, les deux types de particules se sont comportés de façon équivalente. Les auteurs rappellent que l'élévation de ces protéines est associée à un excès de risque de pathologie cardiovasculaire, et que d'autres nuisances telles que l'amiante ou les métaux lourds induisent une augmentation d'HSP 70 ; ils n'ont pas précisé les caractéristiques physiques des noirs de carbone utilisés (granulométrie, surface spécifique).

Tamaoki et coll. (2004) ont montré que l'incubation de cellules épithéliales bronchiques humaines en présence de CBUF augmentait l'incorporation de thymidine et de leucine tritiées, correspondant respectivement à une augmentation de la synthèse de l'ADN et des protéines. Ces effets n'étaient pas observés avec du CB non ultra-fin. Les auteurs suggèrent que ces phénomènes peuvent être à l'origine de l'épaississement de l'épithélium bronchique. L'utilisation d'inhibiteurs d'EAO diminuait ces effets, suggérant un rôle du stress oxydatif. Ces auteurs ont également montré la cascade d'événements membranaires et intracellulaires à l'origine de cette prolifération cellulaire, l'événement essentiel étant la phosphorylation de l'EGF-R (*Epidermal Growth Factor Receptor*).

Beck-Speier et coll. en 2005 ont analysé le potentiel oxydatif de plusieurs PUF (carbone élémentaire ; deux types de CB : Printex 90 et Printex G ; particules diesels) dans un système *in vitro* acellulaire. La réponse de macrophages alvéolaires canins et humains a été analysée (médiateurs lipidiques, peroxydation lipidique). Le carbone élémentaire, correspondant aux PUF présentant la plus grande surface spécifique, a montré le potentiel oxydatif le plus élevé ; celui des autres particules n'a pas atteint 1 % de ce dernier. Toutes les PUF testées ont entraîné la libération d'acide arachidonique, de prostaglandine E2 et de thromboxane B2 par les macrophages alvéolaires canins de manière indépendante à la réponse oxydative observée sur le modèle acellulaire. La production de leucotriène B4 et de 8-isoprostane était élevée uniquement avec les PUF de carbone élémentaire fraîchement émises, tandis que les particules vieilles ne modifiaient pas les taux de ces métabolites, tout comme les autres PUF, et présentaient un potentiel oxydatif moindre. Les effets étaient comparables avec des macrophages alvéolaires humains. Toutes les PUF testées ont entraîné la formation d'EAO par les macrophages alvéolaires. Tous les effets observés étaient étroitement corrélés aux surfaces spécifiques des particules plutôt qu'à leur masse.

Le potentiel oxydatif de particules de CBUF (14 nm, 300 m²/g – 56 nm, 45 m²/g – 95 nm, 20 m²/g) a été confirmé par Koike et Kobayashi (2006) sur des cellules pulmonaires épithéliales de type II et des macrophages alvéolaires de rat. Cette étude a confirmé que les effets observés étaient surface-dépendants.

Barlow et coll. en 2005 ont montré la forte capacité de particules de CBUF, et à un degré moindre de CB fin, à induire la formation de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules épithéliales de type II de rats, induisant la migration des macrophages. Les autres particules testées (TiO₂ fin et ultra-fin) n'ont pas induit de chimiotactisme significatif des macrophages.

1.6.2. Études expérimentales à court terme chez l'animal

| Intratrachéale dose unique

Oberdörster et coll. (1992) ont recherché après administration intratrachéale chez des rats, un effet dose-réponse de la forme cristalline anatase du TiO₂ (20 nm ; 65- 107- 200- 500- 1 000 µg) sur la réponse inflammatoire pulmonaire. Ils ont également comparé ces effets avec ceux de CBUF (20 nm ; 500 µg). Des recueils de liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) ont été réalisés 24 heures plus tard, ainsi qu'une quantification de la masse et de la surface des particules retenues dans le LLBA et le tissu pulmonaire. Le nombre de particules retenues par unité de masse de poumon n'était pas corrélé à la réponse inflammatoire exprimée en polynucléaires neutrophiles (PMN) du LLBA. Seul

un effet dose-réponse a été observé avec l'anatase pour les doses comprises entre 65 et 500 µg. L'instillation de 1 000 µg a entraîné une réponse plus faible. L'administration de CBUF a induit la plus forte réponse. L'analyse des résultats en fonction de la surface des particules retenues par unité de surface du poumon a montré que la réponse en PMN était relativement bien corrélée jusqu'à la dose de 500 µg de TiO_2 , ainsi que le taux de protéines dans le LLBA, quelles que soient les particules testées et leurs doses. 50 % du TiO_2 administré à la dose la plus forte ont été retenus dans le tissu pulmonaire contre 4 % seulement pour le noir de carbone. Ces résultats suggèrent que la réponse inflammatoire, objectivée par le taux de PMN dans le LLBA, diminue avec le taux de particules ayant pénétré dans l'interstitium pulmonaire. Les auteurs suggèrent que le CBUF et ses agglomérats sont plus facilement phagocytés par les macrophages alvéolaires que le TiO_2 , d'où sa pénétration moindre dans l'interstitium et l'induction d'un afflux de PMN plus élevé, médiée par la phagocytose. Ces travaux montrent également que la surface des particules retenues dans le tissu pulmonaire est un marqueur mieux corrélé à la réponse biologique que la masse des particules.

Murphy et coll. (1998) ont montré que l'administration d'une dose unique (1 mg) de CBUF à des rats par instillation intratrachéale n'entraînait pratiquement aucune modification de la perméabilité de l'épithélium pulmonaire et des marqueurs d'inflammation au cours des douze semaines suivant l'exposition, contrairement à ce qui était observé avec des particules de silice cristalline (61 % des particules supérieures à 300 nm) ou des PUF de silice amorphe (7 nm). Les effets de particules diesels (20 nm), de dimension moindre que le noir de carbone testé (50 nm), étaient également minimes comparés à ceux induits par les silices. À noter que les effets observés avec la silice cristalline persistaient jusqu'à la fin de l'étude, alors que ceux observés avec la silice amorphe étaient régressifs.

Brown et coll. (2000) ont étudié *in vitro* et *in vivo* l'effet des métaux de transition de particules de CB, telles quelles ou après traitement par le desféral (complexant des métaux, notamment du Fe^{+++}). Une instillation intratrachéale (0,5 ml d'une suspension de 1 mg/ml de particules) de particules fines (CB, 320 nm) ou ultra-fines (CBUF, 14 nm) a été réalisée sur des rats. Le LLBA a été analysé 24 heures plus tard. Une première analyse a mesuré le taux de lactate déshydrogénase (LDH) et de protéines chez les animaux traités. Le Fe^{+++} libéré par les particules après action du desféral a été quantifié par spectrophotométrie. Enfin, le dosage du taux de calcium libéré à partir de cultures de macrophages alvéolaires exposées à ces différentes suspensions a été réalisé par fluorescence, afin de vérifier si l'homéostasie calcique joue un rôle important dans l'action pro-inflammatoire des particules. Une inflammation plus marquée (augmentation des PMN et du taux de LDH) dans le LLBA a été observée chez les animaux traités avec les PUF que chez ceux exposés avec des CB ; seules les PUF ont induit une inflammation statistiquement significative. Le chélateur n'a pas modifié ces résultats. Lors de l'étude *in vitro*, l'incubation des particules à des concentrations comprises entre 0,3 et

5 mg/ml avec du LLBA de rats témoins a montré une déplétion protéique dose-dépendante, induite par les deux types de particules, avec toutefois un effet nettement plus prononcé pour le CBUF. Ce résultat pourrait être expliqué par une fixation facilitée des protéines à la surface des PUF. Les données *in vitro* ont également montré que l'homéostasie calcique des macrophages alvéolaires était augmentée après exposition aux PUF. L'emploi du desféral n'a pas modifié ces résultats. L'exposition des macrophages alvéolaires à des particules liées à du Fe^{+++} est restée sans effet sur la concentration cytosolique du calcium.

Cette étude suggère que le potentiel inflammatoire des particules de CBUF comparées à CB ne peut être expliqué par la présence de Fe^{3+} à la surface de ces particules ; des différences de surface et de nombres de particules peuvent intervenir.

Wilson et coll. (2002) ont réalisé chez le rat des administrations intratrachéales uniques de CBUF (diamètre 14 nm, surface spécifique 253,9 m^2/g) aux doses de 62,5 ou 125 μg . Ces traitements ont été administrés tels quels ou en présence de 100 ou 500 μM de chlorure de fer. Le LLBA a été recueilli 18 heures plus tard. Un retentissement inflammatoire a été observé par l'augmentation des PMN dans le LLBA après administration de 125 μg de noir de CBUF. Cet effet a été majoré par l'adjonction de 100 μM de chlorure de fer. Le chlorure de fer seul n'a pas induit d'excès d'afflux des PMN comparé aux témoins.

Dick et coll. (2003) ont instillé à des rats une dose unique (125 μg) de 4 types de PUF (oxyde de cobalt CoUF [20 nm ; 36,9 m^2/g], dioxyde de titane TiO_2UF [20 nm ; 49,8 m^2/g], nickel NiUF [20 nm ; 36,2 m^2/g] et CBUF [14 nm ; 253,9 m^2/g]). Un groupe témoin a reçu une solution saline. Le LLBA a été recueilli 4 ou 18 heures plus tard avec étude cellulaire, quantification de la γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), des protéines et de marqueurs d'inflammation (MIP-2 et $\text{TNF-}\alpha$). La détection de radicaux libres a été réalisée avec le test du plasmide. CoUF et CBUF ont induit une augmentation des PMN persistant jusqu'à 18 heures. La réponse induite par NiUF n'était pas statistiquement significative jusqu'à 18 heures, mais devenait par suite comparable à celle observée avec CoUF et CBUF. TiO_2UF n'a pas induit d'augmentation du taux de PMN dans le LLBA comparé aux témoins. La γ -GT est une enzyme liée à la surface des membranes des cellules épithéliales pulmonaires de type II et des cellules de Clara ; l'augmentation de son taux dans le LLBA signe une atteinte cytotoxique. Aucune augmentation de ce taux n'a été observée 4 heures après instillation, quel que soit le type de PUF utilisées ; il était en revanche doublé dans le LLBA prélevé à 18 heures chez les animaux exposés à CoUF et à CBUF. Une légère augmentation non significative a été observée avec TiUF et NiUF.

Le taux de protéines, quel que soit le type de particules, était légèrement augmenté, comparé aux témoins, 4 ou 18 heures après l'instillation. Seuls CoUF et CBUF entraînaient une augmentation significative du taux de MIP-2, 4 heures suivant l'instillation. Les taux de MIP-2 étaient comparables à ceux des contrôles à 18 heures. CoUF, CBUF

et NiUF ont induit la formation de radicaux libres, comparés aux témoins. TiO_2UF est resté sans effet. Cette étude confirme que CBUF est susceptible de provoquer une réponse inflammatoire et cytotoxique pulmonaire rapide après une exposition unique chez des rongeurs. Dans ces conditions, il y a formation de radicaux libres qui peuvent induire un stress oxydatif. On remarquera que le CBUF utilisé présente une surface spécifique particulièrement élevée par rapport aux autres particules. Cette spécificité ne semble pourtant pas le rendre plus toxique que les PUF d'oxyde de cobalt, ce dernier présentant dans cette étude un comportement toxicologique comparable.

Lambert et coll. (2003a) ont étudié sur la souris exposée par voie intratrachéale les effets induits par des co-expositions à du CBUF et du virus respiratoire syncytial (VRS, principale cause d'infections respiratoires basses, notamment de bronchiolite ou de pneumonie virale chez l'enfant). Dans une première étude, les auteurs ont montré que la préexposition à 40 μg de CBUF (taille des particules non précisée, 150 m^2/g) induisait une réponse inflammatoire favorisant le développement d'une réponse allergique, au détriment de la production d'interféron γ nécessaire à la défense antimicrobienne. Dans une deuxième étude (Lambert et coll., 2003b), la même équipe a montré que l'exposition à du CBUF de souris infectées par du VRS majorait le taux de polynucléaires neutrophiles, de lymphocytes, de cytokines et de chimiokines dans le LLBA ainsi que l'hyper-réactivité bronchique.

Renwick et coll. (2004) ont comparé la capacité de particules de TiO_2 , fines (250 nm ; 6,6 m^2/g) ou ultra-fines (TiO_2UF , 29 nm, 49,78 m^2/g) et de noir de carbone (CB [260,2 nm ; 7,9 m^2/g] et CBUF [14,3 nm ; 253,9 m^2/g]) à induire une réaction inflammatoire, des dommages épithéliaux et à affecter la clairance des macrophages alvéolaires ainsi que leur capacité de phagocytose et leur chimiotactisme. L'étude a consisté à instiller par voie intratrachéale chez des rats mâles une dose unique de particules en suspension dans une solution saline (125 μg ou 500 μg). Les deux types de PUF ont induit une augmentation des PMN dans le LLBA prélevé à 24 heures. Les dégâts épithéliaux (évalués d'après l'augmentation de la γ -glutamyl transpeptidase et des protéines) ainsi que la cytotoxicité (augmentation de la lactate déshydrogénase) étaient également plus importants avec les PUF qu'avec les particules fines, à masse égale. Les particules fines et ultra-fines ont détérioré la capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires de façon significative (absorption de billes de latex fluorescentes), avec un effet plus marqué des PUF. Seule l'administration de 500 μg de particules ultra-fines (PUF) augmentait significativement le chimiotactisme des macrophages alvéolaires. Le CBUF induisait plus d'effets que le TiO_2UF et ce retentissement était significatif dès la dose de 125 μg , contrairement au TiO_2UF . Les modifications de la perméabilité de l'épithélium alvéolaire n'étaient significatives qu'à la dose la plus forte pour les deux types de PUF. L'effet cytotoxique était observé après instillation de 500 μg de TiO_2UF et dès 125 μg d'administration de CBUF. Cette étude a montré que le CB entraîne des effets supérieurs à ceux du TiO_2 . Elle renforce le concept selon lequel la finesse de

ces particules et l'importance de leur surface sont fondamentales dans l'induction de l'inflammation, vraisemblablement par l'intermédiaire de la libération de radicaux libres (Dick 2003 ; Wilson 2002). Les effets observés sont, dans cette étude, indépendants de la présence d'ions métalliques.

Chang et coll. en 2005 ont montré que l'administration intratrachéale de 200 µg de CBUF (14 nm ; 253,9 m²/g) à des souris induisait une réaction inflammatoire dans le LLBA des animaux, associée à une production du facteur de croissance VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dont l'effet est d'augmenter la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire. Cet effet semble médié par l'induction d'EAO, comme l'a montré l'exposition de lignées cellulaires de monocytes humains et de cellules épithéliales pulmonaires de type II issues d'adénocarcinomes humains (A549).

Stoeger et coll. ont publié en 2006 une étude dans laquelle six types de particules carbonées (carbone élémentaire uFCP, deux types de suies (L et H), deux types de noir de carbone (Printex 90 et G) et des particules diesels [DEP]) ont été instillés par voie intratrachéale à des souris à trois niveaux de dose (5, 20 et 50 µg). La taille des particules était comprise entre 10 et 50 nm, les surfaces spécifiques entre 30 et 800 m²/g et la charge organique entre 1 et 20 %. L'analyse du LLBA à 24 heures a montré qu'à masse égale les effets inflammatoires (cellules inflammatoires et cytokines pro-inflammatoires) suivaient l'ordre : uFCP > suie L ≥ suie H > Printex 90 > Printex G > DEP. La réponse inflammatoire étant particule-dépendante et fortement dose-dépendante. Aucune des six particules, y compris aux doses les plus fortes, n'a induit l'augmentation de LDH ou de cellules mortes dans le LLBA, suggérant l'absence de lésions aiguës du parenchyme pulmonaire à 24 heures. Les effets pro-inflammatoires observés étaient 2,5 fois plus importants avec le Printex 90 (14 nm) qu'avec le Printex G (50 nm). Le niveau de réponse inflammatoire était fortement corrélé à la surface spécifique des particules. Les auteurs avancent l'existence d'une valeur limite de la surface totale, soit environ 20 cm² chez la souris, au-dessous de laquelle ils n'ont observé aucune réaction pro-inflammatoire aiguë.

Li et coll. (1999) ont réalisé une étude chez le rat par instillation à faible dose (125 µg) de CBUF (Printex 90 : 14 nm ; 253,9 m²/g), afin d'éviter une surcharge pulmonaire. Ils ont observé une inflammation modérée, un stress oxydatif et une diminution du glutathion (GSH) dans le tissu pulmonaire. Les effets étaient moindres avec du CB (260 nm ; 7,9 m²/g). Ces auteurs ont évalué une valeur limite de surface totale chez le rat de 130 cm², cohérente avec les résultats de Stoeger et coll. obtenus chez la souris si l'on considère un ratio de 1/8 entre ces deux espèces (Stone et coll., 1992).

| Inhalation

Gilmour et coll. (2004) ont exposé des rats par inhalation (corps entier) pendant 7 heures à du CBUF (14 nm), à la dose de 1,66 mg/m³ et du CB (260 nm) à la dose de 1,40 mg/m³.

Les auteurs soulignent que l'exposition était constituée de particules agglomérées dont la granulométrie était différente de celle des échantillons initiaux (diamètre aérodynamique médian en nombre 114 nm pour l'aérosol ultra-fin et 268 nm pour l'aérosol fin). Un recueil du LLBA a été effectué 16 et 48 heures après la fin de l'exposition. Seul le CBUF a induit une augmentation du nombre total de leucocytes. L'élévation des PMN du LLBA observée à 16 heures était plus importante pour le CBUF que pour le CB. Outre cette élévation, une augmentation des PMN sanguins a été constatée dans l'heure qui a suivi l'exposition, et 48 heures après, uniquement avec le CBUF. Cette étude n'a pas trouvé de différences notables entre les groupes d'animaux dans l'expression de facteurs de coagulation plasmatiques. Une augmentation de l'ARNm codant pour la cytokine MIP-2 a été trouvée dans le LLBA 48 heures après la cessation de l'exposition au CBUF, mais pas dans le tissu pulmonaire.

| Injection intra-artérielle

Le constat d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité d'origine cardiovasculaire à la suite d'épisodes de pollution atmosphérique a conduit Khandoga et coll. (2004) à administrer à des souris en intra-artériel une suspension de CBUF (14 nm, 300 m²/g), l'objectif étant de reproduire la translocation des particules inhalées vers les veines pulmonaires et la circulation systémique. Deux heures après l'injection, l'analyse du système microvasculaire hépatique a été réalisée par microscopie à fluorescence. L'étude a montré une augmentation de l'accumulation des plaquettes dans l'endothélium des veinules postsinusoïdales et des sinusoïdes. L'adhérence des plaquettes était fortement associée à des dépôts de fibrine et à une augmentation de l'expression du facteur de Willebrand au niveau de la surface endothéliale. Il n'a pas été observé dans ces conditions de réactions inflammatoires, d'atteintes sinusoïdales et des cellules de Küpffer.

1.6.3. Études moyen terme ou par administrations répétées

| Instillations intratrachéales répétées

Dasenbrock et coll. (1996) ont montré l'induction de tumeurs pulmonaires chez des rats exposés à des CBUF par instillations intratrachéales hebdomadaires répétées (16 à 17 semaines ; dose totale par animal 15 mg), y compris avec des noirs de carbone à très faibles teneurs en HAP. Parmi les deux noirs de carbone testés (Printex 90 : 14 nm, 300 m²/g et Lamp Black 101 : 95 nm, 20 m²/g), le Printex 90 a induit 21 % de tumeurs pulmonaires alors que le Lamp Black en a induit 8 %.

Shwe et coll. (2005) ont montré que l'instillation intratrachéale à des souris une fois par semaine pendant 4 semaines de CB (14 nm ou 95 nm) induisait une réaction inflammatoire dose-dépendante (afflux de macrophages, de lymphocytes et de PMN dans le LLBA) avec le CB à 14 nm. La dose la plus élevée était nécessaire pour entraîner un effet significatif avec le CB à 95 nm. Les cytokines IL-6 et TNF- α étaient augmentées dans le LLBA des animaux traités avec le CB à 14 nm comparé aux animaux traités avec le CB à 95 nm. L'IL-1 β était augmentée de façon dose-dépendante pour les deux échantillons. Les fluctuations de chimiokines et de leurs ARNm étaient d'interprétation discutable entre les deux types de CB. Le dépôt de CB dans les ganglions médiastinaux était plus élevé avec le CB à 14 nm.

| Inhalation subchronique

Driscoll et coll. (1996) ont réalisé une étude dont l'objectif était de comprendre les mécanismes favorisant le cancer pulmonaire chez les rats exposés au noir de carbone. Les animaux ont été exposés par inhalation (corps entier) 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 13 semaines à 1,1, 7,1 ou 52,8 mg/m³ de CB (diamètre 16 nm, surface spécifique 220 m²/g). Le retentissement pulmonaire a été examiné après 6,5 et 13 semaines d'exposition, puis 3 et 8 mois après l'arrêt de celle-ci. Après 13 semaines d'exposition à 1,1, 7,1 ou 52,8 mg/m³, les rétentions pulmonaires étaient respectivement de 354, 1 826 et 7 861 μ g. La clairance pulmonaire était ralentie à partir de 7,1 mg/m³. Des atteintes parenchymateuses, une inflammation, une augmentation de l'expression des chimiokines (MIP-2, MCP-1), une hyperplasie épithéliale et une fibrose ont été observées à partir de 7,1 mg/m³ suivant une relation dose-dépendante. Aucun effet n'a été observé à 1,1 mg/m³. Une augmentation de la mutation du gène *hprt* a été observée dans les cellules épithéliales alvéolaires immédiatement après les 13 semaines d'exposition, à partir de 7,1 mg/m³. Ces effets persistaient 3 et 8 mois plus tard chez les animaux ayant été exposés à la dose la plus forte. Aucune mutation génique n'a été observée à 1,1 mg/m³. Des phénomènes de surcharge pulmonaire peuvent être à l'origine des effets observés.

Gallagher et coll. (2003) ont analysé la formation d'une mutation (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-dG) de l'ADN pulmonaire de rats après inhalation subchronique de deux CB (Printex 90 : 16 nm ; 300 m²/g ; Sterling V : 70 nm ; 37 m²/g) présentant des quantités différentes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques adsorbés. Des rats femelles Fischer 344 ont été exposés 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 13 semaines à 1, 7 ou 50 mg/m³ de ces deux échantillons. L'objectif était de comparer les résultats en fonction de la masse ou de la surface des particules retenues. Après 13 semaines d'exposition, des dosages ont été effectués sur des prélèvements pulmonaires, ainsi qu'après une période d'observation de 44 semaines. Une surcharge pulmonaire a été observée aux doses de 7 et 50 mg/m³ de Printex 90 et de 50 mg/m³ de

Sterling V. Aucune rétention pulmonaire n'a été observée avec 1 mg/m³ de Printex 90. Une augmentation significative ($p < 0,05$) de 8-oxo-dG a été observée après 13 semaines d'exposition à 50 mg/m³ de Printex 90 et à la fin de la période d'observation, aux doses de 7 et 50 mg/m³. Aucune augmentation de 8-oxo-dG n'a été observée avec le Sterling V malgré la rétention pulmonaire. D'après les auteurs, ces résultats suggèrent que la rétention pulmonaire en masse de particules n'est pas bien corrélée avec les effets toxiques ; la surface spécifique des particules retenues dans le parenchyme pulmonaire apparaît un meilleur paramètre pour évaluer le retentissement toxicologique de ce type de particules.

Elder et coll. (2005) ont confirmé la sensibilité accrue du rat par rapport à la souris et au hamster lors de l'exposition par inhalation subchronique à différents CBUF. Pour éviter une surcharge pulmonaire, les trois types d'animaux ont été exposés 13 semaines à du CBUF de surface spécifique élevée (HS-CBUF : 14 nm ; 300 m²/g) aux doses de 0, 1, 7 ou 50 mg/m³. Des rats ont été exposés à du CBUF de faible surface spécifique (LS-CBUF : 70 nm ; 37 m²/g). La rétention en particules et l'observation histologique a été réalisée immédiatement après l'exposition, puis à 5 semaines, à 3 mois et à 11 mois. Le niveau de rétention en équivalent de masse était comparable chez les rats exposés aux deux types de CB aux fortes doses. En revanche, en équivalent de surface, la charge pulmonaire était comparable dès les niveaux de doses intermédiaires. La rétention persistait chez les rats à partir de la dose moyenne pour les deux CB, la clairance étant toutefois plus rapide avec le LS-CBUF. Ces effets étaient comparables chez la souris aux mêmes niveaux de doses, et chez les hamsters aux doses élevées. Le retentissement inflammatoire dans le LLBA et dans le parenchyme pulmonaire était plus sévère et prolongé chez le rat que pour les deux autres espèces. Le hamster présente les mécanismes de clairance les plus efficaces et les réponses pulmonaires les moins marquées. Les auteurs proposent un NOAEL à 1 mg/m³ pour le HS-CBUF dans les trois espèces.

| Instillations intranasales répétées

Afin d'étayer expérimentalement l'exacerbation des symptômes asthmatiques dans les populations exposées à l'air chargé de particules, de Haar et coll. (2005) ont réalisé un essai de sensibilisation chez la souris. Des souris ont été exposées par instillation intranasale d'ovalbumine (OVA), seule ou avec différentes quantités (2, 20 ou 200 µg) de CB de diamètres compris entre 30 et 50 nm. Après une exposition à J0, J1, J2, un premier groupe de souris a été sacrifié à J4 et J8. Une phase de déclenchement (ovalbumine) a été réalisée dans un autre groupe à J25, J26, J27. Le dosage des IgE spécifiques a été effectué à J21 et J28. Une réaction inflammatoire immédiate dans le LLBA à J4 a été observée uniquement à la dose de 200 µg de CBUF + OVA. À J8, ce même niveau de dose a induit une augmentation des lymphocytes et des cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10) dans les ganglions lymphatiques péribronchiques. L'effet adjuvant de 200 µg de CBUF sur le

système immunologique des souris a été examiné. Outre l'augmentation des IgE spécifiques de l'ovalbumine observée à J21 et J28 chez les souris exposées à 200 µg de CBUF + OVA, confirmant la sensibilisation systémique, une réaction inflammatoire allergique au niveau des voies respiratoires a été observée après la phase de déclenchement.

Shwe et coll. (2006) ont montré que l'instillation intranasale (125 µg) de CBUF à des souris, répétée une fois par semaine pendant 4 semaines consécutives, induisait un retentissement immunologique (augmentation des ARNm de cytokines et de chimiokines) au niveau du bulbe olfactif. Cet effet était observé uniquement avec le CBUF à 14 nm, et pas avec le CB à 95 nm. L'analyse de l'hippocampe n'a pas montré d'élévation de ces marqueurs, ce qui suggère que la translocation de ces particules n'induit pas ce type d'effet au-delà du bulbe olfactif. Ces résultats étayaient les travaux d'Oberdörster et coll. (2004), qui ont établi que des PUF de carbone élémentaire pouvaient migrer le long des nerfs olfactifs jusqu'au bulbe olfactif après dépôt intranasal chez le rat. Le système nerveux central peut donc être un organe cible de PUF solides présentes dans l'atmosphère.

1.7. Toxicocinétique et biodisponibilité

Oberdörster et coll. (2002) ont montré que du carbone ^{13}C ultra-fin (30 nm) s'accumule dans le foie après 24 heures d'exposition corps entier chez le rat, suggérant un passage de ces particules dans la circulation sanguine. Ce passage pourrait se produire soit à travers l'épithélium alvéolaire soit à travers l'épithélium intestinal, à partir de particules ingérées. Bien que cela n'ait pas été démontré, il est vraisemblable que des PUF de CB puissent avoir un comportement analogue.

Cette équipe a également montré qu'il existait un « effet PUF » dans la capacité à pénétrer l'interstitium pulmonaire, mais que cet effet s'exprimait différemment en fonction de la nature chimique de la particule. Ainsi, 50 % des particules de TiO_2 (20 nm) pénètrent l'interstitium contre 4 % seulement des particules de CB (20 nm ; Oberdörster, 1992). Si la pénétration dans le parenchyme pulmonaire du CBUF ne semble pas très élevée en comparaison à d'autres particules, Shwe et coll. en 2006 ont montré que le dépôt intranasal de CBUF pouvait induire un retentissement immunologique au niveau du bulbe olfactif de souris. Les relations dose-effet restent donc à établir tant au niveau du site de dépôt qu'à distance.

Conclusion

Les études disponibles montrent que le CBUF provoque :

- plus d'effets toxiques que les noirs de carbone de granulométrie plus grossière ;
- des effets inflammatoires (chimiotactisme des macrophages alvéolaires, afflux de polynucléaires neutrophiles, d'ions calciques cytosoliques dans les macrophages,

- augmentation de cytokines et de chimiokines ainsi que de leur ARNm correspondants, augmentation de gènes pro-inflammatoires) ;
- des atteintes macrophagiques alvéolaires : altération de la phagocytose, dysfonctionnements du cytosquelette, cytotoxicité ;
- un stress oxydatif avec la formation d'espèces réactives de l'oxygène ;
- une lipoperoxydation cellulaire ;
- des effets toxiques dont l'importance est liée essentiellement à la surface spécifique plus qu'à la masse des particules. Quelques auteurs ont proposé des valeurs limites de surface spécifique chez des rongeurs ;
- des effets toxiques indépendants de la présence de métaux solubles. En présence de sels métalliques, les résultats sont discordants ;
- une augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire chez la souris exposée par voie intratrachéale, *via* la synthèse d'EAO ;
- des tumeurs pulmonaires et des mutations géniques chez le rat comme avec son homologue de granulométrie plus grossière, avec cependant un effet accru pour les CBUF de surface spécifique élevée. Certains CBUF de faible surface spécifique n'ont pas entraîné de mutations géniques au niveau pulmonaire, contrairement à des CBUF de surface spécifique élevée ;
- un retentissement immunologique au niveau du bulbe olfactif après dépôt intranasal chez le rongeur, contrairement à son homologue de granulométrie plus grossière. Le retentissement de tels effets à long terme sur l'animal reste une inconnue, tout comme l'extrapolation de ces données à l'homme ;
- un effet adjuvant des réactions allergiques respiratoires chez la souris après instillation intranasale ;
- une hyperréactivité bronchique et une majoration de la réponse inflammatoire en cas de coexposition au virus respiratoire syncytial chez la souris.

Concernant la toxicité pulmonaire du CBUF et l'extrapolation des données expérimentales à l'homme, il faut souligner que ces particules semblent avoir une tendance moindre que d'autres à pénétrer l'interstitium pulmonaire. En revanche, elles induisent, *via* une réponse macrophagique accrue, des phénomènes inflammatoires alvéolaires notables. Ceci pose la question de leurs effets potentiels à long terme. Par exemple, les effets de type alvéolite extrinsèque seraient-ils plus marqués, et les risques de fibrose et de cancer pulmonaire moindres, comparés à d'autres particules présentant une capacité de pénétration plus élevée dans le parenchyme ? Le faible nombre d'études effectuées sur le long terme chez l'animal ne permet pas de répondre à cette question ni pour le noir de carbone, ni pour la plupart des particules.

La biodisponibilité et les effets systémiques ont été encore peu à pas explorés. Des études récentes, réalisées soit avec du CBUF soit avec des PUF de structure physicochimique voisine, incitent à initier des recherches complémentaires.

L'étude de la réalité des expositions en milieu de travail, notamment chez les utilisateurs, est indispensable à toute démarche d'évaluation de risque. Cette approche devrait prendre en compte les différentes voies d'exposition potentielles.

Bibliographie

- Barlow P, Clouter-Baker A, Donaldson K, MacCallum J, Stone V (2005). Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. *Part Fibre Toxicol* **2**, 11.
- Beck-Speier I, Dayal N, Karg E, Maier KL, Schumann G, Schulz H, Semmler M, Takenaka S, Stettmaier K, Bors W, Ghio A, Samet JM, Heyder J (2005). Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultra-fine particles. *Free Radical Biol Med* **38**, 1080-1092.
- Blair A, Stewart PA, Hoover RN (1990). Mortality from lung cancer among workers employed in formaldehyde industries. *Am J Ind Med* **17**, 683-699.
- Bourguet CC, Checkoway H, Hulka BS (1987). A case-control study of skin cancer in the tyre and rubber manufacturing industry. *Am J Ind Med* **11**, 462-473.
- Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K (2000). Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med* **57**, 685-691.
- Chang CC, Chiu HF, Wu YS, Li YC, Tsai ML, Shen CK, Yang CY (2005). The induction of vascular endothelial growth factor by ultra-fine carbon black contributes to the increase of alveolar-capillary permeability. *Environ Health Perspect* **113**, 454-460.
- Crosbie WA (1986). The respiratory health of carbon black workers. *Arch Environ Health* **41**, 346-358.
- Dasenbrock C, Peters L, Creutzenberg O, Heinrich U (1996). The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. *Toxicol Letters* **88**, 15-21.
- De Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R (2005). Ultrafine carbon black particles cause early airway inflammation and have adjuvant activity in a mouse allergic airway disease model. *Toxicol Sci* **87**, 409-418.
- Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* **15**, 39-52.
- Driscoll K, Carter J, Howard B, Hassenbein DG, Pepelko W, Baggs RB, Oberdörster G (1996). Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* **136**, 372-380.
- Elder A, Gelein R, Finkelstein JN, Driscoll KE, Harkema J, Oberdörster G (2005) Effects of subchronically inhaled carbon black in three species. I. Retention Kinetics, Lung inflammation, and Histopathology. *Toxicol Sci* **88**, 614-629.

- Gallagher J, Sams 2nd R, Inmon J, Gelein R, Elder A, Oberdorster G, Prahalad AK (2003). Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in rat lung DNA following subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* **190**, 224-231.
- Gardiner K., Van Tongeren M., Harrington M (2001). Respiratory health effects from exposure to carbon black: results of the phase 2 and 3 cross sectional studies in the European carbon black manufacturing industry. *Occup Environ Med* **58**, 496-503.
- Gilmour P.S, Ziesenis A, Rona Morrison ER, Vickers MA, Drost EM, Ford I, Karg E, Mossa C, Schroepel A, Ferron GA, Heyder J, Greaves M, MacNee W, Donaldson K (2004). Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultra-fine carbon black particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 35-44.
- Hodgson JT, Jones RD (1985). A mortality study of carbon black workers employed at five United Kingdom factories between 1947 and 1980. *Arch Environ Health* **40**, 261-268.
- Hoet P et Nemery B (2001). Letters to the editor. Stimulation of phagocytosis by ultra-fine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **176**, 203.
- IARC (1996). Monographs On the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 65: Printing processes and printing inks, carbon black and some nitro compounds. IARC Lyon France, 578 p.
- IARC (2006). Monographs On the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 93: Carbon black, Titanium dioxide and non-asbestiform talc. IARC Lyon France. Sous presse.
- Ingalls TH (1950). Incidence of cancer in the carbon black industry. *Arch Ind Hyg Occup Med* **1**, 662-676.
- Ingalls TH, Riskey-Iribarren R (1961). Periodic search for cancer in the carbon black industry. *Arch Environ Health* **2**, 429-433.
- Khandoga A, Stampfl A, Takenaka S, Schulz H, Radykewicz R, Kreyling W, Krombach F (2004). Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo. *Circulation* **109**, 1320-1325.
- Kim H, Liu X, Kobayashi T, Kohyama T, Wen FQ, Romberger DJ, Conner H, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W, Rennard SI (2003). Ultrafine Carbon black particles inhibit human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 111-121.
- Koike E, Kobayashi T (2006). Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles. *Chemosphere* **65**, 946-951.
- Lambert AL, Trasti FS, Mangum JB, Everitt JI (2003a). Effect of preexposure to ultra-fine carbon black on respiratory syncytial virus infection in mice. *Toxicol Sci* **72**, 331-338.
- Lambert AL, Mangum JB, DeLorme MP, Everitt JI (2003b). Ultrafine carbon black particles enhance respiratory syncytial virus-induced airway reactivity, pulmonary inflammation, and chemokine expression. *Toxicol Sci* **72**, 339-346.
- Li XY, Brown D, Smith S, MacNee W, Donaldson K (1999). Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* **11**, 709-731.
- Manning F and Patierno S (1996). Apoptosis: Inhibitor or instigator of carcinogenesis? *Cancer Invest* **14**, 455-465.
- Möller W, Hofer T, Ziesenis A, Karg E, Heyder J (2002). Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* **182**, 197-207.

- Möller W, Brown D, Kreyling WG, Stone V (2005). Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role in intracellular calcium. *Part Fibre Toxicol* **2**, 7.
- Mossman B and Churg A (1998). State-of-the art: Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 1666-1680.
- Murphy S, Bérubé K, Pooley F, Richards R (1998). The response of lung epithelium to well characterised fine particles. *Life Sci* **62**, 1789-1799.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury : studies with ultra-fine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193-199.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health Part A* **65**, 1531-1543.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* **16**, 437-445.
- Ramage L, Guy K (2004). Expression of C-Reactive Protein and Heat-Shock Protein-70 in the lung epithelial cell line A549, in response to PM10 exposure. *Inhal Toxicol* **16**, 447-452.
- Renwick LC, Donaldson K, Clouter A (2001). Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **172**, 119-127.
- Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultra-fine particle types. *Occup Environ Med* **61**, 442-447.
- Robertson JMcD, Ingalls TH (1980). A mortality study of carbon black workers in the United States from 1935 to 1974. *Arch Environ Health* **35**, 181-186.
- Robertson JMcD, Diaz JF, Fyfe IM, Ingalls TH (1988). A cross-sectional study of pulmonary function in carbon black workers in the United States. *Am Ind Hyg Assoc J* **49**, 161-166.
- Robertson JMcD, Ingalls TH (1989). A case-control study of circulatory, malignant, and respiratory morbidity in carbon black workers in the United States. *Am Ind Hyg Assoc J* **50**, 510-515.
- Robertson JMcD, Inman KJ (1996). Brief communication: Mortality in carbon black workers in the United States. *J Occup Environ Med* **38**, 569-570.
- Shwe T, Yamamoto S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H (2005). Effect of intratracheal instillation of ultra-fine carbon black on proinflammatory cytokine and chemokine release and mRNA expression in lung and lymph nodes of mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **209**, 51-61.
- Shwe T, Yamamoto S, Ahmed S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H (2006). Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol Letters* **163**, 153-160.
- Siemiatycki J (1991). Risk factors for cancer in the workplace. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Sorahan T, Hamilton L, Van Tongeren M, Gardiner K, Harrington JM (2001). A cohort mortality study of UK carbon black workers, 1951-1996. *Am J Ind Med* **39**, 158-170.
- Steineck G, Plato N, Gerhardsson M, Norell SE, Hogstedt C. (1990). Increased risk of urothelial cancer in Stockholm during 1985-87 after exposure to benzene and exhausts. *Int J Cancer* **45**, 1012-1017.

- Stoeger T, Reinhard C, Takenaka S, Schroepfel A, Karg E, Ritter B, Heyder J, Schulz H (2006). Instillation of six different ultra-fine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ Health Perspect* **114**, 328-333.
- Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD (1992). Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**, 235-243.
- Stone V, Shaw J, Brown DM, MacNee W, Faux SP, Donaldson K (1998). The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicol In Vitro* **12**, 649-659.
- Stone V, Brown D, Watt N, Wilson M, Donaldson K, Ritchie H, MacNee W (2000). Ultrafine particle-mediated activation of macrophages: intracellular calcium signalling and oxidative stress. *Inhal Toxicol* **12**, 345-351.
- Stone V, Tuinman M, Vamvakopoulos JE, Shaw J, Brown D, Pettersson S, Faux SP, Borm P, MacNee W, Michaelangeli F, Donaldson K (2000). Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur Respir J* **15**, 297-303.
- Tamaoki J, Isono K, Takeyama K, Tagaya E, Nakata J, Nagai A (2004). Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L1127-L1133.
- Timblin C, Shukla A, Berlinger I, Berube KA, Churg A, Mossman BT (2002). Ultrafine airborne particles cause increases in protooncogene expression and proliferation in alveolar epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **184**, 98-104.
- Vignes J-L, André G, Kapala F (7^e édition 1997-1998). Données sur les principaux produits chimiques métaux et matériaux. Centre de Ressources Pédagogiques en Chimie : Économie et Industrie-EXC-1(RNS de Cachan), 458 p.
- Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V (2002). Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* **184**, 172-179.

2. Pollution particulaire diesel et toxicité

G. Lacroix

2.1. Généralités sur les émissions diesels

Les émissions des moteurs diesels sont un mélange complexe de plusieurs centaines de composés, organiques ou non, gazeux ou particuliers (Kagawa, 2002). La composition de ce mélange varie considérablement selon les conditions dans lesquelles il est produit. Le type de moteur et son régime, l'huile, le carburant, l'utilisation de systèmes de post-traitement etc., sont autant de paramètres qui influent sur la physicochimie de l'échappement diesel (Zelikoff, 2000).

Alors que la fraction gazeuse se compose d'espèces chimiques bien définies (oxydes d'azote, monoxyde et dioxyde de carbone, hydrocarbures volatils...), la fraction

particulaire est un aérosol complexe, dont la définition même varie selon la technique d'échantillonnage. Cette dernière consiste à prélever une partie de l'échappement en sortie de moteur, à le diluer dans de l'air puis à le passer sur un filtre. La quantité de particules émises est estimée par la masse collectée sur le filtre. Tout changement dans la procédure d'échantillonnage (par exemple, le type de filtre utilisé ou les paramètres de dilution employés) peut modifier les résultats. Si les techniques utilisées pour évaluer la masse de particules émises sont bien standardisées (elles sont à la base des normes actuelles en matière de rejets automobiles), les méthodes permettant d'obtenir le nombre de particules ou leur répartition en taille restent encore à harmoniser.

Les particules diesels (ou, par la suite, PED, pour particules d'échappement diesel) ont, dans leur immense majorité, une taille comprise entre 0,02 et 1 μm (certaines sont de l'ordre du nanomètre ; voir plus loin) et se répartissent en deux classes chimiques distinctes : (1) les « suies », particules solides de carbone sur lesquelles se condensent des composés organiques ou inorganiques, et (2) les particules ultra-fines liquides et volatiles, formées de la condensation de composés organiques et soufrés, et comportant peu ou pas de carbone (Mauderly, 2001). Les PED représentent donc un mélange de particules fines et ultra-fines.

Depuis le milieu des années 1990, la distribution en taille des particules issues des moteurs à combustion interne fait l'objet d'une attention particulière en raison de la toxicité potentielle des particules fines et ultra-fines. Typiquement, les PED présentent une distribution en taille bimodale, correspondant à un phénomène de nucléation d'une part, et à un processus d'agglomération (accumulation) d'autre part (voir chapitre 2, figure 2.12, et la figure 6.1, ci-après).

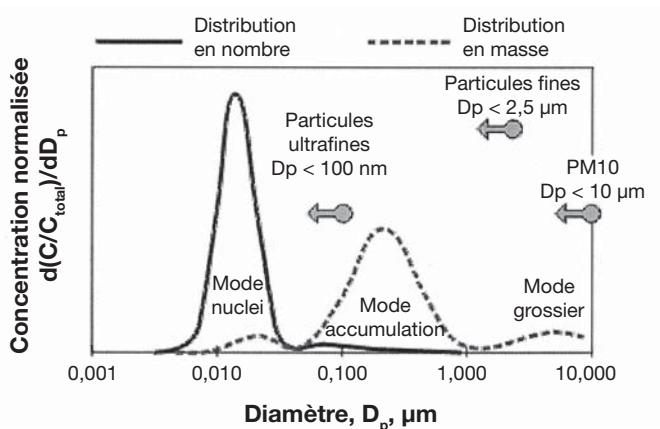


Figure 6.1. Distribution en taille des particules diesels (modifié d'après Kittelson, 2002, cité par Morawska, 2004).

Les particules en mode nucléation sont de très petite taille, comprise entre 0,003 et 0,03 μm (Kittelson, 2002). Souvent appelées nanoparticules, elles résultent essentiellement de la condensation de composés organiques et soufrés volatils, au moment où l'échappement diesel est dilué et refroidi. Une faible proportion de ces particules contient également des composés carbonés ou métalliques solides. Ces particules représentent au moins 90 % du nombre total de particules présentes dans l'échappement diesel, mais ne contribuent que pour une faible part à la masse totale (0,1 à 10 % ; Kittelson, 2002).

L'agglomération de particules solides primaires, carbonées ou autres, sur lesquelles s'adsorbent des gaz ou se condensent des vapeurs, forme ce que l'on appelle les particules en mode accumulation. Elles sont essentiellement composées d'un noyau carboné solide sur lequel se condensent des hydrocarbures lourds, mais on peut également y trouver des composés soufrés, des cendres métalliques, etc. (Morawska, 2004). Ces particules ont une taille comprise approximativement entre 0,04 et 1 μm , la majorité d'entre elles ayant un diamètre de l'ordre de 0,1 à 0,2 μm (Morawska, 2004). Elles contribuent à l'essentiel de la masse totale des particules émises par les moteurs diesels.

Une petite fraction des particules diesels présente un diamètre supérieur au micromètre et forme ce que l'on appelle le mode grossier. Elles ne contribuent quasiment pas au nombre de particules émises mais comptent pour environ 5-20 % de la masse totale des particules de l'échappement. Ces particules ne sont pas formées par combustion mais ont une origine mécanique, se formant au cours de phénomènes d'usure des parois du moteur et du pot d'échappement (Kittelson, 2002).

En résumé, la fraction particulaire des émissions diesels se compose de nombreuses petites particules ne contribuant que peu à la masse totale, mélangées à quelques particules plus grosses formant l'essentiel de la masse totale.

Ces dernières années, l'amélioration du carburant (à faible teneur en soufre) et l'emploi de filtres à particules et/ou de catalyseurs à oxydation ont fortement modifié la composition des émissions diesels. Une diminution importante de la masse de particules émises a notamment été observée (Bunn et coll., 2002 ; Alander et coll., 2004). Plusieurs études ont cependant montré que le nombre de particules émises pouvait être plus important (Morawska, 2004). Ceci s'expliquerait par une plus forte concentration en précurseurs de nanoparticules (hydrocarbures, SO_4), combinée à une diminution de la masse des particules en mode accumulation (Morawska, 2004). Cette évolution doit être prise en compte dans l'évaluation des risques liés au diesel, en travaillant notamment sur les émissions de moteurs de technologie récente, équipés ou non de systèmes de dépollution, sans oublier que des moteurs plus anciens, à la fois plus polluants et produisant une pollution qualitativement différente, sont toujours en circulation.

2.2. Toxicologie de la pollution particulaire diesel

Peu de polluants ont suscité davantage d'études que les émissions diesels. Plusieurs excellentes revues existent sur le sujet (Cohen et Nikula, 1999 ; Grigg, 2002 ; Kagawa, 2002, Pandya et coll., 2002, Sydbom et coll., 2001). Les échappements diesels sont responsables de nombreux effets sur la santé, au niveau pulmonaire notamment, mais des observations récentes suggèrent également une implication au niveau du système cardiovasculaire et des fonctions de reproduction.

On distingue deux grands types d'approches méthodologiques :

- les études menées *par inhalation* consistent à soumettre des volontaires ou des animaux de laboratoire, voire des tissus ou des cellules, à un flux continu d'émissions diesels diluées. Certaines de ces études utilisent des émissions filtrées afin de dissocier les effets induits par la phase gazeuse de ceux induits par les particules. Les concentrations d'exposition en particules sont de l'ordre de 0,1 à 12 mg/m³, pour des durées aiguës (chez l'homme) à chroniques ;
- les études menées *in vivo par instillation* consistent à injecter une solution concentrée de particules en suspension au niveau de la trachée, après anesthésie de l'animal (rat, souris ou hamster). Les concentrations particulières peuvent varier de 20 à 80 mg de particules/ml, ainsi que le nombre d'injections (une par semaine pendant une à plusieurs semaines). La forte acidité des particules liée à la présence de traces d'acide sulfurique nécessite de suspendre les particules dans une solution tampon (pH 7,4) additionnée de 0,05 % de Tween 80 ou de diméthyle sulfoxyde (DMSO). La plupart des études *in vitro* utilisent également des PED remises en suspension dans le milieu de culture.

La majorité des travaux ne permet pas de mettre en évidence un rôle spécifique éventuel des PUF diesels, ni d'évaluer leur degré de contribution à la toxicité globale des émissions diesels. Dans le cas des études par inhalation, les sujets sont exposés à la totalité de l'échappement diesel, c'est-à-dire à la fraction gazeuse comme particulaire. Des systèmes de filtration sont utilisés dans certains cas, mais ils parviennent difficilement à supprimer toutes les particules émises, surtout sans modifier le reste de l'émission. Dans le cas des études par instillation, les particules ont été préalablement récupérées sur filtre avant leur mise en suspension et il est vraisemblable que la granulométrie est modifiée (dans le sens d'une agglomération) par ce procédé. Dans la plupart des cas d'ailleurs, nous ne disposons pas d'informations sur la taille des particules.

Les émissions diesels sont donc ici considérées dans leur globalité, en précisant, le cas échéant, si les observations effectuées sont plutôt le fait de la fraction gazeuse ou particulaire. Les travaux portant sur les particules diesels isolées (PED) ont également été

pris en compte, en apportant le maximum de précisions sur la physicochimie des particules, et notamment leur taille lorsque cette dernière est connue.

2.2.1. Effets pulmonaires (cancer excepté)

| Études expérimentales chez l'homme

Les études expérimentales chez l'homme consistent le plus souvent à exposer des volontaires à des émissions diesels contrôlées, dans une chambre d'exposition. Pour des concentrations en particules de l'ordre de $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$, on note une irritation oculaire et nasale ainsi qu'une sensation d'inconfort liée à l'odeur du diesel (Rudell et coll., 1999). L'utilisation d'un filtre à particules couplé à un filtre à charbon actif (qui piège certains composants gazeux) réduit fortement ces symptômes subjectifs (Rudell et coll., 1999). Aucun effet n'a été noté sur la fonction pulmonaire à cette concentration (Rudell et coll., 1999 ; Salvi et coll., 1999) mais une inflammation pulmonaire a été observée (Salvi et coll., 1999 ; Nordenhall et coll., 2000). L'exposition durant 2 heures de volontaires sains ou asthmatiques à des niveaux environnementaux d'émissions diesels ($\text{PM}_{10} = 108 \mu\text{g}/\text{m}^3$) a induit une augmentation de la résistance des voies aériennes, de même intensité dans les deux groupes. Une inflammation a été relevée chez les volontaires sains, 6 heures après l'exposition, caractérisée par un afflux de neutrophiles au niveau bronchique, une augmentation du nombre de lymphocytes dans le lavage bronchoalvéolaire, une augmentation des teneurs en cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) dans le lavage bronchique, et une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion dans l'endothélium vasculaire bronchique. Chez les asthmatiques, contrairement à ce qui était attendu, il n'a pas été noté d'afflux de neutrophiles, ni d'aggravation de l'inflammation éosinophilique des voies aériennes. En revanche, une augmentation des taux d'IL-10, une cytokine impliquée dans l'inflammation allergique, a été observée au niveau de l'épithélium bronchique (Stenfors et coll., 2004). Bien que la signification de ces réponses reste à élucider, il est cependant intéressant de noter que des effets indéniables ont lieu pour une exposition à des teneurs faibles, et en tout cas en deçà de la norme de qualité de l'air américaine, qui est de $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne sur 24 heures pour les PM_{10} .

| Études expérimentales chez l'animal

Avant de présenter les résultats observés chez l'animal, il convient de rappeler que la plus grande prudence est de rigueur si l'on veut extrapoler les données à l'homme. En plus des mécanismes d'action qui peuvent être différents entre l'homme et l'animal, des études utilisant des particules radioactives ont montré que les doses reçues au niveau des

voies aériennes sont très différentes selon que l'on a affaire à un humain ou à un rongeur. De plus, les doses utilisées chez l'animal sont beaucoup plus élevées que celles auxquelles l'homme est exposé durant sa vie (Sydbom et coll., 2001). On sait peu de chose sur la biodisponibilité et l'activité des composants des émissions diesels à des doses réalistes. On estime que les populations sont exposées à des teneurs environnementales en PED de l'ordre de $1\text{-}10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Zelikoff, 2000). Des mesures effectuées dans les pays scandinaves ont montré que la concentration environnementale moyenne en particules était de l'ordre de $30\text{ à }150\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Sydbom et coll., 2001). Des concentrations jusqu'à $1\text{ }500\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ ont été observées dans certaines zones industrielles (Sydbom et coll., 2001).

Plusieurs études ont montré que les émissions diesels, à des concentrations en particules allant jusqu'à $6\text{ }000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ durant 9 semaines, ont un impact limité sur la mortalité (White et Garg, 1981). Le poids corporel est également peu affecté (Watanabe et Nakamura, 1996). Toutefois, une augmentation du poids des poumons a été notée chez des rats, des souris et des hamsters exposés chroniquement à $4\text{ }000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PED (Heinrich et coll., 1986).

Les études menées chez l'animal aboutissent à des conclusions divergentes en ce qui concerne la fonction pulmonaire. Si des expositions subaiguës (émission diesel diluée au quart pendant 28 jours) n'ont que peu d'effet (Pepelko, 1982 ; Pepelko et coll., 1980), les expositions chroniques montrent une diminution de la fonction pulmonaire chez des chats exposés à $6\text{ }000\text{-}12\text{ }000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ pendant 62 semaines (Moorman et coll., 1985), mais une augmentation chez des rats exposés à $1\text{ }500\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ durant 612 jours (Gross, 1981). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des différences dans les protocoles expérimentaux et les espèces utilisées.

Comme chez l'homme, l'exposition aux émissions diesels induit une inflammation pulmonaire nette, caractérisée par un afflux de macrophages, neutrophiles et parfois éosinophiles dans les espaces alvéolaires des animaux exposés (Heinrich et coll., 1986 ; Henderson et coll., 1988). Des altérations structurales du tissu pulmonaire ont été notées chez de nombreuses espèces (rat, chat, cobaye, hamster) exposées chroniquement aux émissions diesels. Avec le temps, les poumons deviennent gris, puis noirs (Barnhart et coll., 1982 ; White et Garg, 1981). À l'examen histologique, les macrophages contiennent des PED ; un épaississement des parois alvéolaires et du septum est noté, lié à la prolifération des pneumocytes de type II. Par la suite, une fibrose peut se développer (Barnhart et coll., 1982 ; Henderson et coll., 1988, Hyde et coll., 1985). Cette évolution est plus ou moins rapide en fonction de la concentration d'exposition. Les premiers changements s'observent dès 3-4 jours à $6\text{ }000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ (White et Garg, 1981) mais après 15 jours seulement à $750\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Barnhart et coll., 1981). Ces concentrations sont cependant très élevées par rapport aux teneurs environnementales.

Un ensemble de paramètres cliniques, biologiques, histopathologiques et biochimiques a été évalué chez des rats ou des souris exposés durant une semaine ou six mois à des

émissions diesels fraîches (teneur en particules 30, 100, 300 ou 1 000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, diamètre aérodynamique moyen entre 0,1 et 0,15 μm). L'état général, le poids corporel et de divers organes (reins, foie, poumons, rate, thymus), l'hématologie et la biochimie sanguine, la cytologie et la biochimie des lavages bronchoalvéolaires (protéines, LDH, cellules totales, médiateurs de l'inflammation : $\text{TNF-}\alpha$, MIP-2, IL-1 β), l'induction de micronoyaux et de tumeurs, n'ont été que peu modifiés par l'exposition (Reed et coll., 2004).

Ces résultats montrent que l'exposition à court ou moyen terme de rats et de souris à des niveaux environnementaux d'émissions diesels contemporaines n'a que peu d'effets (et est d'intensité modérée) sur la santé.

Les effets d'une exposition aux émissions diesels sur la sensibilité aux infections pulmonaires sont variables selon les études. La résistance aux infections bactériennes semble altérée chez des souris exposées à un échappement diesel contenant 3 000 ou 6 000-7 000 μg de particules/ m^3 (Campbell et coll., 1981 ; Hiramatsu et coll., 2005), contrairement aux infections virales (Campbell et coll., 1981). En revanche, la croissance virale était plus importante chez des animaux exposés à 2 000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PED durant 3 à 6 mois (Hahon et coll., 1985). Plusieurs études ont montré une diminution de la clairance alvéolaire des particules après exposition au diesel (Chan et coll., 1984 ; Griffis et coll., 1983 ; Heinrich et coll., 1986 ; Mauderly et coll., 1989). Il semble qu'il existe un seuil au-dessus duquel une rétention des particules et une inflammation pulmonaire se produisent. Ce seuil a été estimé à 500 μg de particules par gramme de tissu pulmonaire (Pritchard, 1989) ; il est cependant difficile de corrélérer cette valeur aux concentrations atmosphériques en particules (Sydbom et coll., 2001).

Une étude ayant donné lieu à deux publications a porté sur la comparaison de deux échantillons de particules diesels, l'un plus ancien, issu de l'échappement d'un chariot élévateur (particules de référence SRM 2975, NIST), l'autre issu des émissions d'un moteur automobile (A-PED). La composition physicochimique, ainsi que divers effets biologiques (inflammation pulmonaire, mutagénicité) ont été évalués (DeMarini et coll., 2004 ; Singh et coll., 2004). Les deux échantillons ont montré une activité mutagène (DeMarini et coll., 2004) ainsi qu'une toxicité pulmonaire (Singh et coll., 2004). Toutefois, les auteurs ont montré que les échantillons étaient très différents dans leur composition chimique (les A-PED étant riches en composés organiques tandis que les SRM 2975 étaient essentiellement formées de particules insolubles de carbone) et leur taille (plus de particules agrégées $> 50 \mu\text{m}$ pour les A-PED que pour les SRM 2975, surface plus fine et poreuse des SRM 2975, coloration gris-jaune des suspensions de A-PED, noire pour les SRM 2975). Une différence a également été notée dans la réponse inflammatoire pulmonaire des souris (afflux de polynucléaires neutrophiles pour les SRM 2975 et afflux de macrophages pour les A-PED, augmentation des teneurs en IL-6 dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire pour les SRM 2975, augmentation des teneurs en IL-6, $\text{TNF-}\alpha$ et MIP-2 pour les A-PED). Ce travail ne

permet pas de déterminer quelle caractéristique des particules est responsable des effets observés, mais il souligne l'intérêt de l'évaluation comparative et multidisciplinaire d'échantillons de particules. Curieusement, c'est la première fois que deux échantillons de PED ont été comparés de façon approfondie, à la fois d'un point de vue chimique et toxicologique.

| Études *in vitro*

Des études *in vitro* ont permis de souligner le rôle des PED dans le développement de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques. Il a été montré que l'exposition de cellules épithéliales bronchiques à la concentration de 50 µg/ml augmentait significativement la résistance électrique des cellules et diminuait la fréquence de battement ciliaire (Bayram et coll., 1998).

Les PED (aux concentrations de 50 et 100 µg/ml et 20 µg/cm²) semblent également capables d'induire la libération de cytokines inflammatoires comme l'interleukine-8 (IL-8), l'IL-1 et le GM-CSF (Bayram et coll., 1998, 1999a, 1999b, 2000). Une étude plus récente, utilisant une technique de culture permettant aux cellules d'être en contact avec l'air, et donc d'être directement exposées aux particules, a montré que les PED étaient capables d'induire immédiatement la production d'IL-8 chez des cellules épithéliales alvéolaires préexposées au TNF-α après 50 minutes d'exposition (Cheng et coll., 2003). Une comparaison avec des particules issues d'un moteur à essence (PEE) a montré que, pour une concentration similaire (environ 1-2 millions particules/cm³ pour l'essence et 1,5-3,5 millions particules/cm³ pour le diesel), les PEE induisaient une production plus importante d'IL-8 que les PED, mais seulement 2 heures après la fin de l'exposition. Le nombre de particules de taille supérieure à 20 nm était beaucoup plus important pour les PEE que pour les PED, ce qui pourrait impliquer plus fortement la masse dans la toxicité liée aux PEE comparativement aux PED.

Doornaert et coll. (2003a, 2003b) émettent l'hypothèse que l'exposition de cellules épithéliales bronchiques aux PED est capable d'altérer les interactions cellules-matrice et la cohésion cellulaire en diminuant, aux concentrations de 20 et 100 µg/mL, certaines molécules d'adhésion (intégrines et CD44) et en fragilisant le cytosquelette d'actine (aux concentrations de 5, 20 et 100 µg/mL). Ces altérations s'expriment par un potentiel de réparation tissulaire moindre et une diminution de la capacité des cellules à adhérer à leur support.

L'exposition durant 3 heures de tranches de poumon de rat à des émissions diesels diluées, conservant notamment les paramètres physicochimiques des particules (distribution en taille log-normale avec un mode à 90 nm), a induit une réponse pro-inflammatoire marquée, des cassures d'ADN et un stress oxydant. Lorsque les particules sont supprimées par filtration, la réponse inflammatoire et les altérations de l'ADN sont

fortement diminuées, suggérant un rôle prépondérant de la fraction particulaire par rapport à la fraction gazeuse pour ces paramètres biologiques (Bion et coll., 2002). L'ajout d'isoflavones dans le milieu de culture, deux heures avant exposition, protège les tranches de poumon contre l'inflammation et le stress oxydant, en limitant la perte de glutathion intracellulaire (Morin et coll., 2002).

2.2.2. Effets cancérigènes

Plusieurs organisations ont fait le bilan des études épidémiologiques et expérimentales s'étant intéressées au lien entre émissions diesels et cancer du poumon. Elles ont classé (ou proposé une classification) des échappements diesels (ou de la fraction particulaire des émissions diesel, PED) en cancérigènes « potentiels », « possibles », « probables » ou « définis » chez l'homme (HEI, 1995 ; IARC, 1989 ; NIOSH, 1988 ; US EPA, 2002 ; WHO, 1996).

Les études épidémiologiques ne permettent pas d'associer avec certitude exposition aux émissions diesels (encore moins aux particules elles-mêmes) et survenue de cancers du poumon, en raison de l'absence de données sur les expositions aux émissions diesels des cohortes étudiées. Certaines études semblent mettre en évidence une augmentation de l'incidence de cancer du poumon parmi des cheminots ou des conducteurs de camion, qui ne serait pas liée à des facteurs confondants connus comme le tabac par exemple (revues dans US EPA, 2002). Mais l'absence de données fiables sur les expositions aux constituants des émissions diesels limite la portée des conclusions que l'on peut tirer de ces études. Souvent, l'évaluation des expositions a été faite de façon rétrospective, en utilisant des mesures récentes sur d'autres populations, mais les résultats n'ont pas permis de dégager une relation de cause à effet (Valberg et Watson, 2000). Certains ont évalué les risques de mortalité par cancer sur 70 ans à partir de différentes études épidémiologiques (Lloyd et Cackette, 2001). Les valeurs de risque sont comprises entre 10^{-4} et $3 \cdot 10^{-3}$ par μg de PED. Cette variation importante (plus de 30 fois) reflète l'imprécision des estimations des expositions, ce qui a fait dire qu'un intervalle de risque serait plus approprié qu'une valeur unique (Chow, 2001). Finalement, un rapport du Health Effect Institute recommande de ne pas initier de nouvelles études épidémiologiques sur le risque cancérigène lié au diesel tant que l'on n'a pas amélioré les moyens (par la recherche de traceurs spécifiques par exemple) pour évaluer les expositions des populations (HEI, 2002).

Les nombreuses études expérimentales initiées chez les rongeurs fournissent toutefois quelques éléments de réponse.

Aucun effet n'a été noté chez les hamsters ou les souris (revue par Mauderly, 1992).

Chez le rat, les émissions diesels (PED) se sont révélées cancérigènes pour des expositions à long terme de l'ordre de 2 mg/m^3 ou plus, ce qui correspond approximativement

à 1 mg/m³ en exposition continue (Kagawa, 2002). L'emploi de filtres à particules a montré que les émissions filtrées n'étaient pas cancérogènes pour le rat. Ces études révèlent l'importance de la fraction particulaire dans le développement du cancer du poumon, mais ne permettent pas de déterminer si ce sont les particules en elles-mêmes ou les composés organiques adsorbés qui sont responsables de l'apparition des tumeurs (Cohen et Nikula, 1999). D'autres études ont montré que le potentiel cancérogène des particules diminuait quand divers composés organiques (incluant des mutagènes et des cancérogènes) étaient supprimés (Kagawa, 2002). Néanmoins, l'inhalation par les rats de dioxyde de titane ou de noir de carbone ne contenant pas de composés organiques a produit des tumeurs pulmonaires similaires à celles provoquées par les PED. Il en a été conclu que le cancer du poumon chez le rat pouvait être non spécifique, et dû à une surcharge des poumons lors d'expositions prolongées à de fortes concentrations en particules (Mauderly, 1996 ; McClellan, 1996). De plus, Valberg et Crouch (1999), en combinant les données issues de huit études chez le rat, ont montré un seuil d'apparition des tumeurs de l'ordre de 200-600 µg/m³ de PED pour une exposition vie entière. Une exposition continue en dessous de 600 µg/m³ n'induit pas de cancer pulmonaire chez le rat. Il n'est donc pas prouvé que les PED aient une action tumorigène à faibles doses.

Un grand nombre de travaux, utilisant des tests bactériens, ont montré que les fractions particulaire et gazeuse de l'échappement diesel avaient une activité mutagène. Des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs ont été également induits dans les cellules de mammifères par les particules et les extraits (US EPA, 2002). Certains pensent cependant que les niveaux environnementaux de PED (environ 1,5 µg/m³) ne présentent pas assez de potentiel mutagène pour poser un risque cancérogène (Bunn et coll., 2002).

Une réévaluation plus récente a confirmé le fait que les études disponibles ne fournissaient pas de données suffisantes pour une estimation quantitative du risque cancérogène des émissions diesels (Bunn et coll., 2004).

2.2.3. Effets sur l'allergie

Depuis ces vingt dernières années, une augmentation rapide des cas d'allergies, notamment respiratoires telles que l'asthme ou la rhinite, est observée dans les pays industrialisés. Cette évolution est trop rapide pour être liée à des changements d'ordre génétique ; il est couramment admis que des facteurs environnementaux sont en cause (Sydbom et coll., 2001).

Une des premières études suggérant que les PED pouvaient augmenter les réponses allergiques au niveau de l'appareil respiratoire est celle de Takafugi et coll. (1987), qui ont montré que la réponse IgE chez des souris exposées par instillation intranasale à

l'ovalbumine était plus importante lorsque des PED étaient ajoutées à la solution d'ovalbumine.

Des études épidémiologiques ont associé l'exposition à des niveaux élevés d'émissions diesels et le développement de manifestations allergiques respiratoires. Trois cheminots exposés à de fortes concentrations d'émissions diesels ont développé des symptômes de type asthme, notamment une hyperréactivité bronchique et une altération de la circulation de l'air dans les voies aériennes, réversibles en utilisant des bronchodilatateurs (Wade et Newman, 1993). Aucun de ces travailleurs ne présentait d'affections respiratoires préexistantes. On sait maintenant que l'effet irritant de certains composants des émissions diesels (aérosols acides, composés organiques volatils...) peut être responsable de l'exacerbation de certains symptômes de l'asthme pour des niveaux d'exposition élevés (Pandya et coll., 2002).

Il existe également des indications épidémiologiques d'une association entre une exposition chronique aux émissions diesels à des concentrations environnementales et une augmentation du nombre et de la sévérité de symptômes respiratoires. Par exemple, plusieurs études ont montré que des enfants ayant grandi dans une région polluée sont susceptibles de développer plus d'affections respiratoires et d'allergies que des enfants ayant vécu dans une zone moins polluée (Heinrich et coll., 1999 ; Van Niekerk et coll., 1979). Au sein d'une même zone, des enfants vivant près de routes à fort trafic ont une incidence plus élevée de symptômes respiratoires chroniques que ceux vivant le long de routes moins fréquentées (Brunekreef et coll., 1997 ; Oosterlee et coll., 1996). Exposés à des niveaux comparables de pollen de cèdre du Japon, les personnes vivant dans des zones de forte circulation routière présentent des réactions allergiques exacerbées par rapport à des individus vivant dans des zones rurales (Ishizaki et coll., 1987).

Malgré toutes ces observations, il est difficile d'évaluer précisément la contribution des émissions diesels, car il n'existe pas de marqueurs spécifiques de l'exposition aux PED. Néanmoins, les études expérimentales chez l'homme et l'animal ont confirmé le lien entre exposition aux PED et exacerbation des allergies respiratoires.

| Effets immunologiques directs des particules diesels

Il a été montré que les PED augmentaient la production d'IgE au niveau des muqueuses respiratoires chez l'homme. L'exposition de volontaires sains à 300 µg de telles particules a augmenté significativement les niveaux en IgE dans le fluide nasal, suite à une augmentation du nombre de cellules sécrétant des IgE et à une altération de l'expression des ARNm codant pour les IgE (Diaz-Sanchez et coll., 1994, 1996). En comparaison, aucun effet n'a été noté sur la production d'IgG, d'IgA ou d'IgM. Bien que la plupart des études confirment ces observations, une étude chez la souris

n'a pas montré d'augmentation de la production d'IgE en réponse aux PED seules (Ohta et coll., 1999).

Les émissions diesels peuvent également stimuler la prolifération des éosinophiles. Les granules de ces cellules contiennent des chimiokines, des leucotriènes et des protéines toxiques. La dégranulation des éosinophiles dans les muqueuses induit une inflammation bronchique et contribue aux symptômes de l'asthme (Pandya et coll., 2002).

Des volontaires sains exposés à des émissions diesels présentent, au niveau de biopsies des bronches, un nombre plus important d'éosinophiles et de molécules inflammatoires, 6 heures après l'exposition (Salvi et coll., 1999a). Toutefois, une étude similaire n'a pas montré d'augmentation d'éosinophiles dans les crachats induits de volontaires, 4 heures après exposition à des PED (Nightingale et coll., 2000). Cela peut s'expliquer par le fait que la méthode des crachats est moins sensible que les biopsies pour détecter des inflammations légères au niveau des voies aériennes inférieures (Pandya et coll., 2002).

Des éosinophiles incubés avec des PED présentent une plus grande adhérence aux cellules épithéliales nasales humaines et une plus grande capacité à libérer leurs granules (Terada et coll., 1997).

Chez l'animal, l'éosinophilie induite par les PED est augmentée en présence d'allergènes tels que l'ovalbumine et s'accompagne d'une augmentation de l'hyperréactivité bronchique non spécifique (Ichinose et coll., 1998 ; Takano et coll., 1998).

L'exposition aux PED peut également augmenter les niveaux de diverses cytokines et chimiokines. Ces molécules sont des messagers chimiques clés dans le processus inflammatoire de l'asthme. Ainsi, des volontaires sains exposés par voie nasale à 150 µg de PED mises en suspension dans une solution saline, ont exprimé des cytokines de type Th2 (c'est-à-dire impliquées dans les réactions allergiques) dans les cellules de la muqueuse nasale, 18 à 24 heures après exposition (Diaz-Sanchez et coll., 1996).

| Effet adjuvant des particules diesels

Bien que l'exposition aux PED seules puisse promouvoir des effets sur certains paramètres de l'allergie, de nombreux travaux ont montré que leur action est potentialisée en présence d'allergène (effet adjuvant).

Des études par instillation nasale chez l'homme ont montré que l'exposition aux PED (300 µg, correspondant grossièrement à la quantité inhalée en 1 à 3 jours à Los Angeles), conjointement à un allergène d'ambroisie, augmentait l'expression de toutes les cytokines de type Th2 dans le fluide nasal (Diaz-Sanchez et coll., 1997) et induisait une plus forte production d'IgE spécifiques de l'ambroisie, avec un maximum 4 jours après l'exposition (Diaz-Sanchez, 1997 ; Diaz-Sanchez et coll., 1997). Les niveaux d'IgG4

(une isoforme d'IgG qui est liée à l'expression des IgE) étaient également augmentés, sans modification des autres formes d'IgG.

Une étude novatrice a évalué la capacité des PED à induire une réponse allergique envers un nouvel antigène chez des sujets atopiques non fumeurs. Ces derniers ont été exposés à trois reprises à l'hémocyanine de patelle (KLH), un composé envers lequel les humains ne sont normalement pas sensibilisés. Vingt-quatre heures avant chaque exposition au nouvel antigène, les sujets étaient exposés par voie intranasale à 300 µg de PED. Les personnes exposées seulement au KLH n'ont pas développé d'IgE contre cet antigène, alors que celles exposées en plus aux particules ont développé des IgE spécifiques au KLH ainsi que des niveaux élevés en IL-4 (Diaz-Sanchez et coll., 1999). Cette étude montre que les PED peuvent induire une nouvelle sensibilisation allergique à un antigène.

Plus récemment, l'exposition durant 1 heure de volontaires non allergiques à des émissions diesels (PM₁₀, 300 µg/m³) a montré une augmentation, au niveau de l'épithélium bronchique, de l'expression de l'IL-13, qui est une cytokine impliquée dans le développement de la réaction immunitaire de type Th2 (allergie), mais non de l'IL-18, qui est une cytokine impliquée dans la régulation de la réaction de type Th1 (résistance aux infections ; Pourazar et coll., 2004).

Les études chez l'animal ont confirmé le fait que les PED altéraient la production d'IgE spécifiques à un allergène. Chez la souris sensibilisée à l'ovalbumine, les PED augmentent la production d'IgE anti-ovalbumine après instillations intranasales ou intratrachéales répétées (Takafuji et coll., 1987). Elles augmentent également les réponses IgE spécifiques après des injections intrapéritonéales répétées de particules et d'allergène (ovalbumine ou pollen de cèdre du japon ; Muranaka et coll., 1986). Chez la souris, l'instillation intranasale de PED et d'ovalbumine induit une prolifération *in vitro* en réponse à l'ovalbumine et augmente la production d'IL-4, par rapport aux souris exposées à l'ovalbumine seule (Fujimaki et coll., 1994 ; Fujimaki et coll., 1995). Des cobayes exposés aux PED durant 5 semaines et sensibilisés une fois par semaine à l'ovalbumine, ont produit sept fois plus d'IgG anti-ovalbumine que les animaux sensibilisés et exposés à l'air, indiquant que cette réponse n'est pas spécifique de la souris (Kobayashi, 2000). Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat, où l'exposition conjointe à des particules et des grains de pollens de phléole a induit des niveaux plus élevés en IgE et IgG sériques (Steerenberg et coll., 1999).

Les mécanismes d'action à l'origine de ces effets sont à l'étude. Le stress oxydant pourrait jouer un rôle important mais, en raison de la complexité des émissions diesels et des centaines de composés présents à la surface des particules, il est probable que d'autres mécanismes d'action soient en cause, surtout que certains effets des particules ne sont pas atténués par une exposition préalable aux antioxydants (Riedl et Diaz-Sanchez, 2005).

En plus de ces effets moléculaires, les PED peuvent physiquement agir comme transporteurs d'allergènes, augmentant les doses de ces derniers au niveau pulmonaire. Enfin, la fraction ultrafine des PED pourrait également exercer des effets indépendamment de sa composition chimique, en pénétrant les composants cellulaires tels que les mitochondries (Riedel et Diaz-Sanchez, 2005).

À l'heure actuelle, les contributions relatives du corps de la particule par rapport aux substances adsorbées vis-à-vis de l'activité adjuvante des PED ne sont pas connues. De la même façon, on ne connaît pas la contribution exacte des PED par rapport aux autres dans l'exacerbation des allergies respiratoires. Enfin, on ne sait pas si les émissions diesels inhalées, à des concentrations de l'ordre de celles rencontrées dans l'environnement ou le milieu professionnel, peuvent avoir des effets adjuvants sur les réactions allergiques.

Pour finir, une étude originale a évalué les effets liés à une ingestion de PED chez la souris (Yoshino et Sagai, 1999). On sait en effet que les particules atteignent non seulement l'appareil respiratoire mais également la muqueuse du tractus gastro-intestinal. Cette étude a montré que les particules, au niveau de la muqueuse intestinale, se comportaient aussi comme un adjuvant, augmentant la réponse à l'allergène et la production d'IgG1 spécifiques.

2.2.4. Effets sur le système cardiovasculaire

Des études épidémiologiques ont associé une augmentation de la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires avec des épisodes de forte pollution atmosphérique, caractérisée notamment par des concentrations élevées en particules (Dockery, 2001 ; Peters et coll., 2001 ; Peters et Pope, 2002). Il a été suggéré que les particules ultra-fines étaient à l'origine d'une inflammation pulmonaire chez les individus sensibles, ainsi que d'une libération de médiateurs et d'une augmentation de la capacité du sang à coaguler (Donaldson et coll., 2001).

Les études expérimentales s'étant intéressées à l'influence des émissions diesels sur les réponses cardiovasculaires sont encore peu nombreuses. Des volontaires sains ont été exposés à de l'air et à des émissions diesels diluées durant 1 heure (Salvi et coll., 1999b). Ces dernières étaient bien caractérisées : $300 \mu\text{g PM}_{10}/\text{m}^3$, $4,3 \cdot 10^6$ particules/ cm^3 , 21,6 ppm de NO_2 , 4,5 ppm de NO, 7,5 ppm de CO, 4,3 ppm d'hydrocarbures totaux et 0,26 mg/ m^3 de formaldéhyde. Une augmentation significative des neutrophiles et des plaquettes a été observée dans le sang, montrant qu'une exposition aiguë aux émissions des moteurs diesels a des effets sur les cellules inflammatoires sanguines.

Chez l'animal, une étude s'est intéressée aux effets des PED sur le processus de thrombose expérimentale (Nemmar et coll., 2003). Des PED de référence (SRM 1650, NIST), instillées dans la trachée de hamsters aux doses de 5 à 500 μg , ont induit une

augmentation de la formation de caillots plaquettaires artériels ou veineux. Des échantillons de sang prélevés chez des hamsters 30 à 60 minutes après instillation de 50 µg de PED ont montré une activation des plaquettes circulantes, qui serait, selon les auteurs, en adéquation avec la survenue de thromboses rapportées chez l'homme après exposition aux polluants.

Un effet direct des PED a été étudié dans un modèle d'oreillette isolée chez le cobaye (Sakakibara et coll., 1994). Des PED à faibles doses (10-500 µg/ml) ont induit une augmentation transitoire mais dose-dépendante de la force de contraction. À l'inverse, aux doses supérieures à 500 µg/ml, la force de contraction a diminué, allant jusqu'à l'arrêt cardiaque. Les auteurs en ont conclu que cette toxicité cardiaque pouvait contribuer à l'œdème pulmonaire souvent observé chez les animaux décédés après exposition aux PED. Il est cependant peu probable que l'homme soit exposé à d'aussi fortes concentrations que celles réalisées au cours de cette expérience.

Les effets cardiovasculaires ne semblent pas uniquement liés aux PED. D'autres études utilisant des particules urbaines ou des résidus de combustion (ROFA) ont montré une altération de certains paramètres liés aux processus de coagulation du sang (voir le chapitre 3).

Ces résultats méritent d'être confirmés et approfondis. Il reste à déterminer les mécanismes par lesquels les particules, notamment diesels, agissent au niveau cardiovasculaire.

2.2.5. Effets sur la reproduction et le développement

Certains rapports suggèrent une diminution du nombre de spermatozoïdes et de la qualité du sperme chez l'homme, notamment en Europe (Jorgensen et coll., 2001). Divers composés chimiques environnementaux pourraient affecter le système reproducteur mâle.

Des études ont montré que des extraits organiques de PED possédaient des activités œstrogéniques ou anti-œstrogéniques (Mori et coll., 2002 ; Taneda et coll., 2000 ; Taneda et coll., 2002). Les extraits de PED pourraient donc être capables d'affecter la santé en altérant la fonction endocrine *via* des interactions avec des récepteurs hormonaux (aux œstrogènes dans ce cas).

Les effets d'extraits de PED sur les spermatozoïdes humains ont été étudiés dans un système *in vitro* (Fredericsson et coll., 1993) : l'extrait modifie de façon dose-dépendante la motilité des spermatozoïdes. Après 18 heures d'exposition, des modifications de la vélocité, de la linéarité et de l'amplitude des mouvements ont été observées. Cependant, le test de survie *in vitro* utilisé dans cette étude conduit en lui-même à ce genre de modifications. Ces articles n'apportent pas d'informations quant à la nature et à la concentration des émissions de diesel utilisées.

Chez l'animal, des études ont été menées pour déterminer si les émissions diesels affectaient les fonctions de reproduction chez le mâle.

Des rats ont été exposés soit à des émissions totales de moteur diesel (contenant 5,63 mg/m³ de particules, 4,10 ppm de NO₂ et 8,10 ppm de NO ; groupe 1), soit à des émissions filtrées (groupe 2), soit à de l'air (groupe 3 ; Watanabe et Oonuki, 1999). L'exposition s'est déroulée sur 3 mois avec 6 heures d'exposition par jour, 5 jours par semaine. Une diminution significative des hormones de la glande pituitaire (FSH, LH) et une augmentation des niveaux sériques de testostérone et d'œstradiol ont été observées dans les groupes 1 et 2. Même si le poids testiculaire ne semble pas varier après exposition, la production de spermatozoïdes ainsi que l'activité hyaluronidase testiculaire ont diminué dans les groupes 1 et 2. La hyaluronidase est un enzyme intervenant notamment dans le renouvellement des membranes cellulaires comme la cellule de Sertoli, cellule nourricière, protectrice et de soutien des cellules germinales mâles. Comme les effets ne sont pas inhibés par la filtration, la phase gazeuse de ces émissions apparaît plus en cause que les particules pour perturber le système endocrinien.

Une étude chez la souris suggère que les émissions diesels (contenant 300 µg/m³ de particules) peuvent altérer la fonction testiculaire par une action directe sur les testicules (Yoshida et coll., 1999).

Dans une étude plus récente, des rats âgés de 13 mois ont été exposés durant 8 mois à de l'air ou à un échappement diesel contenant 300, 1 000 ou 3 000 µg/m³ de particules, d'un diamètre aérodynamique moyen de 0,4 µm (Tsukue et coll., 2001). Les poids corporels et testiculaires n'ont pas été affectés. En revanche, une altération du poids de diverses glandes a été relevée (à la dose de 300 µg/m³, diminution significative du poids de la prostate, du thymus et des surrénales, à la dose de 3 000 µg/m³, augmentation du poids de la prostate, des vésicules séminales et des glandes de la coagulation). De plus, une augmentation du taux de certaines hormones (LH, testostérone) a été notée aux trois doses.

Les émissions diesels semblent également affecter le développement fœtal chez le rat. Des femelles gestantes ont été exposées aux émissions totales de moteur diesel (5 630 µg/m³ de particules dont 90 % mesurant moins de 0,5 µm, 4,1 ppm de NO₂ et 8,1 ppm de NO), à du gaz d'échappement filtré ou à de l'air ambiant du 7^e au 20^e jour de gestation (Watanabe et Kurita, 2001). L'observation principale est la masculinisation des fœtus exposés pendant la gestation aux gaz d'échappement de moteurs diesels, filtrés ou non. Ceci pourrait être la conséquence d'une accumulation d'hormones sexuelles liée à une altération métabolique.

Plus récemment, Tsukue et coll. (2002) ont démontré un effet de l'exposition de souris femelles non gestantes à des concentrations de 300, 1 000 ou 3 000 µg de PED/m³ (diamètre aérodynamique moyen 0,4 µm) sur leur descendance. La première partie de leur travail a consisté à exposer ces souris sans les accoupler. Il a ainsi été montré une

diminution du poids de l'utérus pour une concentration de 1 mg de PED/m³. Après accouplement avec des mâles non exposés, le nombre d'avortements et de problèmes à la mise bas augmente par rapport aux animaux témoins exposés à de l'air filtré, mais ceci de manière non significative. Dans les portées issues des femelles exposées, des retards de croissance et de maturation sexuelle ainsi que des malformations ont été observées chez les mâles comme chez les femelles, avec par exemple une ouverture précoce de l'orifice génital (exposition à 0,3 et 1 mg de PED/m³), une diminution de la distance anogénitale chez les mâles âgés de 30 jours (exposition à 0,3 mg de PED/m³) ou encore des diminutions du poids relatif de certains organes. Il semble donc que les substances toxiques contenues dans les émissions de moteur diesel soient responsables de la perturbation de la mise bas chez des souris exposées avant accouplement, ainsi que d'un retard de la croissance et de la maturation sexuelle dans les portées.

Une autre étude a montré que l'inhalation de PED au cours de la différenciation de ce système immunitaire accélérerait l'élévation des IgE dirigés contre le pollen, potentialisant son allergénicité au cours de la gestation (Watanabe et Ohsawa, 2002).

Des études complémentaires doivent être conduites, notamment pour clarifier la relation entre la production d'hormones sexuelles après exposition aux PED pendant la gestation et les troubles de la reproduction observés chez la descendance.

Conclusion

Les émissions diesels, et notamment la fraction particulaire (PED), ont été largement étudiées depuis le début des années 1980. L'exposition aux échappements diesels induit des effets à plus ou moins long terme tels qu'irritation transitoire, inflammation, altération de la fonction pulmonaire. Comme le souligne l'US EPA dans son document de synthèse de 2002, les émissions diesels exacerbent également les allergies respiratoires et l'asthme, et pourraient induire des cancers pulmonaires pour des expositions de longue durée (US EPA, 2002).

Il reste cependant beaucoup d'inconnues, en particulier sur les mécanismes d'action et sur le rôle des caractéristiques physicochimiques des échappements diesels dans leur toxicité. Des études doivent être entreprises en ce sens, qui permettraient notamment d'améliorer la réglementation en matière de rejets polluants.

Un effort particulier doit être entrepris pour identifier les populations à risque. On sait déjà que les individus ayant une pathologie respiratoire et/ou cardiovasculaire préexistante sont susceptibles d'être plus sensibles à la pollution diesel, et plus spécialement particulaire. Mais des investigations récentes semblent mettre en évidence une sensibilité génétique à la pollution. Ainsi, certains génotypes conduisant à une sous-expression de composés antioxydants induisent une sensibilité plus grande à l'effet adjuvant des PED (Riedl et Diaz-Sanchez, 2005).

Considérant la complexité des émissions diesels et leur énorme variabilité potentielle (y compris pour un moteur donné), une collaboration plus active entre chercheurs de différentes disciplines (chimistes, toxicologues, ingénieurs motoristes...) serait à développer, et un panel important de différents échantillons devrait pouvoir circuler entre plusieurs équipes de recherche pour permettre des analyses comparatives (Arey, 2004). En ce sens, les matériaux de référence peuvent jouer un rôle de tout premier plan, sous réserve de produire de nouveaux lots représentatifs des innovations technologiques récentes.

Ces dernières, notamment l'évolution constante des moteurs, des systèmes de dépollution et de la composition chimique des carburants et huiles, imposent une réévaluation périodique des conséquences de l'exposition aux émissions diesels sur la santé (US EPA, 2002).

Bibliographie

- Alander TJA, Leskinen AP, Raunemaa TM, Rantanen L (2004). Characterization of diesel particles: Effects of fuel reformulation, exhaust aftertreatment, and engine operation on particle carbon composition and volatility. *Environ Sci Technol* **38** (9), 2707-2714.
- Arey J (2004). A tale of two diesels. *Environ Health Perspect* **112**(8), 812-813.
- Barnhart MI, Chen ST, Salley SO, Puro H (1981). Ultrastructure and morphometry of the alveolar lung of guinea pigs chronically exposed to diesel engine exhaust: six month's experience. *J Appl Toxicol* **1**(2), 88-103.
- Barnhart MI, Salley SO, Chen ST, Puro H (1982). Morphometric ultrastructural analysis of alveolar lungs of guinea pigs chronically exposed by inhalation to diesel exhaust (DE). *Dev Toxicol Environ Sci* **10**, 183-200.
- Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, Ohtoshi T, Miyabara Y, Sagai M, Davies RJ (1998). The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**(3) 441-448.
- Bion A, Fall M, Gouriou F, Le Prieur E, Dionnet F, Morin JP (2002). Biphasic culture of rat lung slices for pharmacotoxicological evaluation of complex atmospheres. *Cell Biology and Toxicology* **18**(5) 301-314.
- Boland S, Baeza Squiban A, Bonvallet V et coll. (1999a). Phagocytosis and cytokine release after exposure of human airway epithelial cells to diesel exhaust particles or carbon black. In: International Inhalation Symposium, 22-25 February 1999.
- Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chevrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M, Marano F (1999b). Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells *in vitro* and alter cytokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **276**(4) L604-613.
- Boland S, Bonvallet V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier M, Marano F (2000). Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**(1) L25-L32.

- Bruneekreef B, Janssen NA, de Hartog J, Harssema H, Knape M, van Vliet P (1997). Air pollution from truck traffic and lung function in children living near motorways. *Epidemiology* **8**(3) 298-303.
- Bunn WB, Hesterberg TW, Valberg PA, Hart G, Lapin CA (2004). A reevaluation of the literature regarding the health assessment of diesel engine exhaust. *Inhal Toxicol* **16**(14) 889-900.
- Bunn WBI, Valberg PA, Slavin TJ, Lapin CA (2002). What is new in diesel? *Int Arch Occup Environ Health* **75**, S122-S132.
- Campbell KI, George EL, Washington IS (1981). Enhanced susceptibility to infection in mice after exposure to dilute exhaust from light duty diesel engines. *Environ Int* **5**, 377-382.
- Chan TL, Lee PS, Hering WE (1984). Pulmonary retention of inhaled diesel particles after prolonged exposures to diesel exhaust. *Fundam Appl Toxicol* **4**(4) 624-631.
- Cheng MD, Malone B, Storey JM (2003). Monitoring cellular responses of engine-emitted particles by using a direct air-cell interface deposition technique. *Chemosphere* **53**(3) 237-243.
- Chow JC (2001). Diesel engines: environmental impact and control. *J Air Waste Manag Assoc* **51**(9) 1258-1270.
- Cohen AJ, Nikula K (1999). The health effects of diesel exhaust: laboratory and epidemiologic studies. In: *Air pollution and health* (S. T. Holgate, Samet, J.M, Koren, H.S, Maynard, R.L, eds.), pp. 707-745. Academic Press, London.
- DeMarini DM, Brooks LR, Warren SH, Kobayashi T, Gilmour MI, Singh P (2004). Bioassay-directed fractionation and Salmonella mutagenicity of automobile and forklift diesel exhaust particles. *Environ Health Perspect* **112**(8) 814-819.
- Diaz-Sanchez D (1997). The role of diesel exhaust particles and their associated polycyclic aromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. *Allergy* **52**(38) 52-58.
- Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenaka H, Saxon A (1994). Diesel exhaust particles induce local IgE production *in vivo* and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest* **94**(4) 1417-1425.
- Diaz-Sanchez D, Garcia MP, Wang M, Jyräla M, Saxon A (1999). Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J Allergy Clin Immunol* **104**(6) 1183-1188.
- Diaz-Sanchez D, Tsien A, Casillas A, Dotson AR, Saxon A (1996). Enhanced nasal cytokine production in human beings after *in vivo* challenge with diesel exhaust particles. *J Allergy Clin Immunol* **98**(1) 114-123.
- Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A (1997). Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human *in vivo* nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol* **158**(5) 2406-2413.
- Dockery DW (2001). Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ Health Perspect* **109** (Suppl. 4), 483-486.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W (2001). Ultrafine particles. *Occup Environ Med* **58**(3) 211-216, 199.
- Doornaert B, Leblond V, Galiacy S, Gras G, Planus E, Laurent V, Isabey D, Lafuma C (2003a). Negative impact of DEP exposure on human airway epithelial cell adhesion, stiffness, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**(1) L119-132.

- Doornaert B, Leblond V, Planus E, Galiacy S, Laurent VM, Gras G, Isabey D, Lafuma C (2003b). Time course of actin cytoskeleton stiffness and matrix adhesion molecules in human bronchial epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* **287**(2) 199-208.
- Fredericsson B, Moller L, Pousette A, Westerholm R (1993). Human sperm motility is affected by plasticizers and diesel particle extracts. *Pharmacol Toxicol* **72**(2) 128-133.
- Fujimaki H, Nohara O, Ichinose T, Watanabe N, Saito S (1994). IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particulates and antigen. *Toxicology* **92**(1-3) 261-268.
- Fujimaki H, Saneyoshi K, Nohara O, Shiraishi F, Imai T (1995). Intranasal instillation of diesel exhaust particulates and antigen in mice modulated cytokine productions in cervical lymph node cells. *Int Arch Allergy Immunol* **108**(3), 268-273.
- Griffis LC, Wolff RK, Henderson RF, Griffith WC, Mokler BV, McClellan RO (1983). Clearance of diesel soot particles from rat lung after a subchronic diesel exhaust exposure. *Fundam Appl Toxicol* **3**(2), 99-103.
- Grigg J (2002). The health effects of fossil fuel derived particles. *Arch Dis Child* **86**(2), 79-83.
- Gross KB (1981). Pulmonary function testing of animals chronically exposed to diluted diesel exhaust. *J Appl Toxicol* **1**(2), 116-123.
- Hahon N, Booth JA, Green F, Lewis TR (1985). Influenza virus infection in mice after exposure to coal dust and diesel engine emissions. *Environ Res* **37**(1), 44-60.
- HEI (1995). Diesel exhaust: a critical analysis of emissions, exposure and health effects. A special Report of the Institute's Diesel Working Group. Health Effects Institute, Cambridge, MA.
- HEI (2002). Research directions to improve estimates of human exposure and risk from diesel exhaust. A special report of the Institute's Diesel Epidemiology Working Group. Health Effect Institute.
- Heinrich J, Hoelscher B, Wjst , Ritz B, Cyrys, Wichmann HE (1999). Respiratory diseases and allergies in two polluted areas in East Germany. *Environ Health Perspect* **107**(1) 53-62.
- Heinrich U, Muhle H, Takenaka S, Ernst H, Fuhst R, Mohr U, Pott F, Stöber W (1986). Chronic effects on the respiratory tract of hamsters, mice and rats after long-term inhalation of high concentrations of filtered and unfiltered diesel engine emissions. *J Appl Toxicol* **6**(6), 383-395.
- Henderson RF, Pickrell, JA, Jones, RK, Sun JD, Benson JM, Mauderly JL, McClellan RO (1988). Response of rodents to inhaled diluted diesel exhaust: biochemical and cytological changes in bronchoalveolar lavage fluid and in lung tissue. *Fundam Appl Toxicol* **11**(3), 546-567.
- Hiramatsu K, Saito Y, Sakakibara K, Azuma A, Takizawa H, Sugawara I (2005). The effects of inhalation of diesel exhaust on murine mycobacterial infection. *Exp Lung Res* **31**(4), 405-415.
- Hyde DM, Plopper, CG, Weir, AJ, Murnane RD, Warren DL, Last JA, Pepelko WE (1985). Peribronchiolar fibrosis in lungs of cats chronically exposed to diesel exhaust. *Lab Invest* **52**(2), 195-206.
- IARC (1989). Diesel and gasoline engine exhaust and some nitroarenes. World Health Organisation. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, Sagai M (1998). Long-term exposure to diesel exhaust enhances antigen-induced eosinophilic inflammation and epithelial damage in the murine airway. *Toxicol Sci* **44**(1), 70-79.
- Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y, Kushibiki E (1987). Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy* **58**(4), 265-270.

- Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, Andersen AN, Auger J, Cawood EH, Horte A, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Vierula M, Toppari J, Skakkebaek NE (2001). Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* **16**(5), 1012-1019.
- Kagawa J (2002). Health effects of diesel exhaust emissions--a mixture of air pollutants of world-wide concern. *Toxicology* **181-182**, 349-353.
- Kittelson BD, Watts WF, Johnson J (2002). Diesel aerosol sampling methodology – CRC E-43: Final report of Minnesota, Report for the Coordinating Research Council, 19 August 2002. [http://www.crcao.com/reports/recentstudies00-02/UMN %20Final %20E-43 %20Report.pdf](http://www.crcao.com/reports/recentstudies00-02/UMN%20Final%20E-43%20Report.pdf).
- Kobayashi T (2000). Exposure to diesel exhaust aggravates nasal allergic reaction in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* **162**(2), 352-356.
- Lloyd AC, Cackette, TA (2001). Diesel engines: environmental impact and control. *J Air Waste Manag Assoc* **51**(6), 809-847.
- Mauderly JL (1992). Diesel exhaust. In *Environmental toxicants: human exposures and their health effects*. Van Nostrand Reinhold, New-York.
- Mauderly JL (1996). Lung overload: the dilemma and opportunities for resolution. *Inhal Toxicol* **8**, 1-28.
- Mauderly JL (2001). Diesel emissions: is more health research still needed? *Toxicol Sci* **62**(1), 6-9.
- Mauderly JL, Bice DE, Cheng YS, Gillett NA, Henderson RF, Pickrell JA, Wolff RK (1989). Influence of experimental pulmonary emphysema on the toxicological effects from inhaled nitrogen dioxide and diesel exhaust. *Res Rep Health Eff Inst*, **30**, 1-47.
- McClellan RO (1996). Lung cancer in rats from prolonged exposure to high concentrations of carbonaceous particles: implication for human risk assessment. *Inhal Toxicol* **8** 193-226.
- Moorman WJ, Clark JC, Pepelko WE, Mattox J (1985). Pulmonary function responses in cats following long-term exposure to diesel exhaust. *J Appl Toxicol* **5**(5), 301-305.
- Morawska L, Moore MR, Ristovski ZD (2004). Health impact of ultrafine particles – Deskop literature review and analysis. Report of the Australian Government, Department of the Environment and Heritage. <http://www.deh.gov.au/atmosphere/airquality/publications/health-impacts/pubs/health-impacts.pdf>.
- Mori Y, Taneda S, Hayashi H, Sakushima A, Kamata K, Suzuki AK, Yoshino S, Sakata M, Sagai M, Seki K (2002). Estrogenic activities of chemicals in diesel exhaust particles. *Biol Pharm Bull* **25**(1) 145-146.
- Morin JP, Rumigny JF, Bion A, Dionnet F (2002). Isoflavones protect against diesel engine exhaust injury in organotypic culture of lung tissue. *Environ Toxicol Pharmacol* **12** (4) 213-220.
- Muranaka M, Suzuki S, Koizumi K, Takafuji S, Miyamoto T, Ikemori R, Tokiwa H (1986). Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J Allergy Clin Immunol* **77**(4), 616-623.
- Nemmar A, Hoet PH, Dinsdale D, Vermeylen J, Hoylaerts MF, Nemery B (2003). Diesel exhaust particles in lung acutely enhance experimental peripheral thrombosis. *Circulation* **107**(8), 1202-1208.
- Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P, Donnelly LE, Rogers DF, Kinnersley R, Fan Chung K, Barnes PJ, Ashmore M, Newman-Taylor A (2000). Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *Am J Respir Crit Care Med* **162**(1), 161-166.

- NIOSH (1988). *Carcinogenic effects of exposure to diesel exhaust*. National Institute for Occupational Safety and Health. Centers for Disease Control, Atlanta, GA. Report n° 88-116.
- Nordenhall C, Pourazar J, Blomberg A, Levin JO, Sandstrom T, Adelroth E (2000). Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J* **15**(6), 1046-1051.
- Ohta K, Yamashita N, Tajima M, Miyasaka T, Nakano J, Nakajima M, Ishii A, Horiuchi T, Mano K, Miyamoto T (1999). Diesel exhaust particulate induces airway hyperresponsiveness in a murine model: Essential role of GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* **104**(5), 1024-1030.
- Oosterlee A, Drijver M, Lebrecht E, Brunekreef B (1996). Chronic respiratory symptoms in children and adults living along streets with high traffic density. *Occup Environ Med* **53**(4), 241-247.
- Pandya RJ, Solomon G, Kinner A, Balmes JR (2002). Diesel exhaust and asthma: Hypotheses and molecular mechanisms of action. *Environ Health Perspect* **110**, 103-112.
- Pepelko WE (1982). Effects of 28 days exposure to diesel engine emissions in rats. *Environ Res* **27**(1), 16-23.
- Pepelko WE, Mattox JK, Yang YY, Moore W Jr (1980). Pulmonary function and pathology in cats exposed 28 days to diesel exhaust. *J Environ Pathol Toxicol* **4** (2-3), 449-457.
- Peters A, Pope CA (2002). Cardiopulmonary mortality and air pollution. *Lancet* **360** (9341), 1184-1185.
- Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA (2001). Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* **103**(23), 2810-2815.
- Pourazar J, Frew AJ, Blomberg A, Helleday R, Kelly FJ, Wilson S, Sandstrom T (2004). Diesel exhaust exposure enhances the expression of IL-13 in the bronchial epithelium of healthy subjects. *Resp Med* **98** (9), 821-825.
- Pritchard JN (1989). Dust overloading causes impairment of pulmonary clearance: evidence from rats and humans. *Exp Pathol* **37**(1-4), 39-42.
- Reed MD, Gigliotti AP, McDonald JD, Seagrave JC, Seilkop SK, Mauderly JL (2004). Health effects of subchronic exposure to environmental levels of diesel exhaust. *Inhal Toxicol* **16**(4), 177-193.
- Riedl M, Diaz-Sanchez D (2005). Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol* **115**(2), 221-228.
- Rudell B, Wass U, Horstedt P, Levin JO, Lindahl R, Rannug U, Sunesson AL, Ostberg Y, Sandstrom T (1999). Efficiency of automotive cabin air filters to reduce acute health effects of diesel exhaust in human subjects. *Occup Environ Med* **56**(4), 222-231.
- Sakakibara M, Minami M, Endo T, Hirafuji M, Murakami S, Mori Y, Sagai M (1994). Biological effects of diesel exhaust particles (DEP) on isolated cardiac muscle of guinea pigs. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **86**(1), 99-110.
- Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, Frew A (1999a). 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**(3) 702-709.
- Salvi SS, Frew A, Holgate S (1999b). Is diesel exhaust a cause for increasing allergies? *Clin Exp Allergy* **29** (1), 4-8
- Salvi S, Holgate ST (1999). Mechanisms of particulate matter toxicity. *Clin Exp Allergy* **29** (9), 1187-1194.

- Singh P, DeMarini DM, Dick CAJ, Tabor DG, Ryan JV, Linak WP, Kobayashi T, Gilmour MI (2004). Sample characterization of automobile and forklift diesel exhaust particles and comparative pulmonary toxicity in mice. *Environ Health Perspect* **112** (8), 820-825.
- Steenberg PA, Dormans JAMA, vanDoorn CC, Middendorp S, Vos JG, van Loveren H (1999). A pollen model in the rat for testing adjuvant activity of air pollution components. *Inhal Toxicol* **11**(12), 1109-1122.
- Stenfors N, Nordenhall C, Salvi SS, Mudway I, Soderberg M, Blomberg A, Helleday R, Levin JO, Holgate ST, Kelly FJ, Frew AJ, Sandstrom T (2004). Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J* **23**(1), 82-86.
- Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stenfors N, Sandstrom T, Dahlen SE (2001). Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J* **17**(4), 733-746.
- Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, Tadokoro K, Miyamoto T, Ikemori R, Muranaka M (1987). Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J Allergy Clin Immunol* **79**(4), 639-645.
- Takano H, Ichinose T, Miyabara Y, Shibuya T, Lim HB, Yoshikawa T, Sagai M (1998). Inhalation of diesel exhaust enhances allergen-related eosinophil recruitment and airway hyperresponsiveness in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **150**(2), 328-337.
- Takenaka H, Zhang K, Diaz-Sanchez D, Tsien A, Saxon A (1995). Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. *J Allergy Clin Immunol* **95**(1 Pt 1), 103-115.
- Taneda S, Hayashi H, Sakata M, Yoshino S, Suzuki A, Sagai M, Mori Y (2000). Anti-estrogenic activity of diesel exhaust particles. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **23**(12), 1477-1480.
- Taneda S, Hayashi H, Sakushima A, Seki K, Suzuki AK, Kamata K, Sakata M, Yoshino S, Sagai M, Mori Y (2002). Estrogenic and anti-estrogenic activities of two types of diesel exhaust particles. *Toxicology* **170**(1-2), 153-161.
- Terada N, Maesako K, Hiruma K, Hamano N, Houki G, Konno A, Ikeda T, Sai M (1997). Diesel exhaust particulates enhance eosinophil adhesion to nasal epithelial cells and cause degranulation. *Int Arch Allergy Immunol* **114**(2), 167-174.
- Tsukue N, Toda N, Tsubone H, Sagai M, Jin WZ, Watanabe G, Taya K, Birumachi J, Suzuki AK (2001). Diesel exhaust (DE) affects the regulation of testicular function in male Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health A* **63** (2), 115-126.
- Tsukue N, Tsubone H, Suzuki A K (2002). Diesel exhaust affects the abnormal delivery in pregnant mice and the growth of their young. *Inhal Toxicol* **14**(6), 635-651.
- US EPA (2002). *Health Assessment Document for Diesel Exhaust*. US Environmental Protection Agency, Washington DC. Report n° EPA/600/8-90/057F.
- Valberg PA, Crouch EAC (1999). Meta-analysis of rat lung tumors from lifetime inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect* **107**(9), 693-699.
- Valberg PA, Watson,AY (2000). Lack of concordance between reported lung-cancer risk levels and occupation-specific diesel-exhaust exposure. *Inhal Toxicol* **12**(Suppl. 1), 199-208.
- Van Niekerk CH, Weinberg EG, Shore SC, Heese HV, Van Schalkwyk J (1979). Prevalence of asthma: a comparative study of urban and rural Xhosa children. *Clin Allergy* **9** (4), 319-314.
- Wade JF, Newman LS (1993). Diesel asthma. Reactive airways disease following overexposure to locomotive exhaust. *J Occup Med* **35**(2), 149-154.

- Watanabe N, Kurita M (2001). The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect* **109**(2), 111-119.
- Watanabe N, Nakamura T (1996). Inhalation of diesel engine exhaust increases bone mineral concentrations in growing rats. *Arch Environ Contam Toxicol* **30**(3), 407-411.
- Watanabe N, Ohsawa M (2002). Elevated serum immunoglobulin E to *Cryptomeria japonica* pollen in rats exposed to diesel exhaust during fetal and neonatal periods. *BMC Pregnancy Childbirth* **2**(1), 2.
- Watanabe N, Oonuki Y (1999). Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environ Health Perspect* **107**(7), 539-544.
- Watson AY, Valberg PA (1996). Particle-induced lung tumors in rats: evidence for species specificity in mechanisms. *Inhal Toxicol* **8**, 227-257.
- White HJ, Garg BD (1981). Early pulmonary response of the rat lung to inhalation of high concentration of diesel particles. *J Appl Toxicol* **1**(2), 104-110.
- WHO (1996). *Diesel fuel and exhaust emissions*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. International Program on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 171.
- Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, Sugawara I, Takeda K (1999). Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl* **22**(5), 307-315.
- Yoshino S, Sagai M (1999). Induction of systemic Th1 and Th2 immune responses by oral administration of soluble antigen and diesel exhaust particles. *Cell Immunol* **192**(1), 72-78.
- Zelikoff JT (2000). Woodsmoke, kerosene, heater emissions, and diesel exhaust. In: *Pulmonary Immunotoxicology* (Z. J. Cohen MD, Schlesinger RB, eds.), pp. 369-386. Kluwer Academic, Boston/Dordrecht/London.

3. Fullérènes

D. Lafon

3.1. Nature

En 1985, Harold Kroto (université du Sussex, Angleterre), Robert Curl et Richard Smalley (tous deux de l'université Rice, à Houston, États-Unis) ont découvert les fullérènes, molécules de carbone pur en forme de cage, ce qui leur a valu l'attribution du prix Nobel de chimie en 1996 (Kroto, 1997).

Le premier fullérène découvert fut le « *buckyball* », appelé aussi buckminsterfullérène, en hommage à Buckminster Fuller, architecte inventeur du dôme géodésique. Cette molécule forme une cage quasi sphérique de 60 atomes de carbone disposés en douze pentagones et vingt hexagones (Holister et coll., 2003 ; figure 6.2). Les 90 arêtes représentent les liaisons entre atomes de carbone, dont 30 sont doubles et 60 simples. La

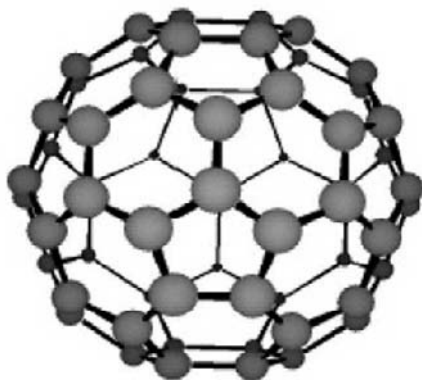


Figure 6.2. La molécule de fullérène C_{60} est le plus souvent comparée à un ballon de football. Sa taille est inférieure au nanomètre. (D'après <http://www.imp.cnrs.fr/utilisateurs/guillard/page3.html>)

famille des fullérènes représente la troisième forme allotropique du carbone après le graphite et le diamant.

D'autres fullérènes, comportant plus ou moins d'atomes de carbone (C_{70} et plus ; Birkett, 2001 ; Holister et coll., 2003 ; Saito et coll., 2004), ont été découverts par la suite. Ils peuvent prendre les formes d'une sphère, d'un ellipsoïde, d'un tube (voir les nanotubes, chapitre suivant), ou d'un anneau.

Pour qu'un fullérène soit stable, les pentagones ne doivent en principe pas être adjacents (des exceptions ont été trouvées avec des métalofullérènes C_{80} endohédraux). D'une façon générale, on définit les fullérènes C_{2n} comme des structures fermées, composées de $(n-20)/2$ hexagones et de 12 pentagones. La plus petite molécule sphérique répondant à cette définition est le C_{20} , identifiée par spectrométrie de masse lors de la débromation de dodécahédranes polybromés de composition moyenne $C_{20}HBr_{13}$ (Birkett, 2001). Le diamètre du C_{60} est de 10 angströms (Mathis et coll., 1997).

De nombreux dérivés de fullérènes – principalement du C_{60} – ont été synthétisés et étudiés. Leurs propriétés dépendent fortement des groupements attachés (Sayes et coll., 2004 ; Isakovic et coll., 2006). Ils ne sont pas présentés dans cette partie, qui se limite aux fullérènes proprement dits, et plus particulièrement au plus étudié d'entre eux, le C_{60} (voir figure 6.2).

3.2. Production

Les fullérènes sont produits naturellement en petites quantités dans les feux, et artificiellement par l'homme, dans les suies de vaporisation du graphite par rayonnement laser, ou encore dans les émissions des moteurs diesels (Su et coll., 2004).

La production de fullérènes a démarré en 1990, au moyen d'un arc électrique entre électrodes graphites. Les fullérènes produits par cette méthode contiennent pour la plupart 60 ou 70 atomes de carbone, mais certains en contiennent plusieurs centaines. On peut obtenir le C_{60} pratiquement pur par lavage avec un solvant, tel que le toluène. La production a été développée ultérieurement par combustion de solvants aromatiques.

3.3. Propriétés physicochimiques

Une caractérisation fine des propriétés des fullérènes est difficile. L'une des raisons est la grande capacité du C_{60} à piéger ses solvants d'extraction, de nombreux hydrocarbures, et des gaz, notamment l'oxygène de l'air, aptitude qui semble partagée par d'autres fullérènes tels que C_{70} , C_{66} ou C_{84} . La sublimation semble la meilleure méthode de purification. La température de décomposition du C_{60} se situerait dans l'intervalle 1 400-1 550 K.

Les fullérènes sont des molécules très solides. À température ambiante et à très haute pression (supérieure à 150 000 atmosphères), la structure en cage du C_{60} s'effondre et le nouveau matériau devient plus dur que le diamant (Rassat et coll., 1997).

Le C_{60} est un bon accepteur d'électrons. Les réactions d'oxydoréduction sont nombreuses. De nombreux produits ont été synthétisés, tels que des sels de fullérènes ou des organométalliques ; la chimie des fullérènes est riche et complexe (Gross, 1997 ; Birkett, 2001). Les fullérènes peuvent ainsi présenter, à leur surface, différents groupements ou espèces chimiques (hydroxyle, acide carboxylique, proline, polyamine, aldéhyde, pyrrolidine, polyvinylpyrrolidone, polyéthylène glycol, cyclodextrine, cyclopropane...) qui modifient leurs caractéristiques physicochimiques. Ainsi, la greffe de fonctions acide carboxylique sur le C_{60} donne des carboxyfullérènes, amphiphiles, dans un état intermédiaire entre l'état amorphe et l'état cristallin (Rassat et coll., 1997).

D'autre part, ces structures peuvent renfermer, comme dans une cage, d'autres espèces chimiques comme des alcalins (Na, K, Rb, Cs ; exemple de composés endohédriques comme $Li_{12}@C_{60}$; Birkett, 2001). Ces dérivés peuvent être supra-conducteurs dans certaines conditions.

En remplaçant un carbone de la structure par un atome d'azote, on obtient des nano-anions.

Les fullérènes peuvent jouer un rôle de catalyseur.

Le C_{60} est insoluble dans l'eau et le DMSO (Sera et coll., 1996), légèrement soluble dans l'éthanol et plus encore dans les solvants benzéniques, le disulfure de carbone, le tétrahydrofurane, et notamment dans le 1,2-dichlorobenzène. Le comportement dans l'eau du C_{60} semble complexe et pas totalement éclairci ; il y forme des agrégats d'au moins 13 molécules (Birkett, 2001), dénommés « nano- C_{60} » ou « n- C_{60} », dont la

taille dépend du pH et de la vitesse d'agitation lors de l'introduction dans l'eau. Les propriétés de ces agrégats peuvent différer sensiblement du matériau d'origine (Fortner et coll., 2005 ; Brant et coll., 2005), ce qui pourrait avoir des conséquences inattendues dans l'environnement. Brancher des groupements chimiques modifie considérablement – et logiquement, puisqu'il ne s'agit plus de la même molécule – les propriétés (Sayes et coll., 2004, 2005a, b ; Isakovic et coll., 2006).

3.4. Utilisations

Les applications des fullérènes et de leurs dérivés sont très nombreuses. On compte actuellement plus de 2 000 brevets couvrant de la microélectronique aux domaines pharmaceutiques et biomédicaux (Moussa, 2004). On peut citer par exemple (Bernier et coll., 1997 ; Rassat et coll., 1997) :

- l'optique non linéaire ;
- les matériaux ultra-durs ;
- les réseaux de C_{60} greffés, qui pourraient constituer de nouveaux matériaux apparentés aux polymères avec des propriétés mécaniques et électroniques inhabituelles.

Des dérivés des fullérènes sont également utilisés en biologie (Bosi et coll., 2003).

Les fullérènes peuvent être incorporés dans des polymères. Ils ont également des propriétés électriques particulières (supra-conducteurs).

3.5. Propriétés toxicologiques

Dans cette partie, ne sont traitées que des études consacrées aux fullérènes. Seules certaines études portant sur des dérivés sont rapportées lorsqu'elles peuvent éclairer la discussion sur la molécule mère.

3.5.1. *In vitro*

| Production de radicaux oxygénés

Arbogast et coll. (1991) ont montré que le fullérène C_{60} exposé à un rayonnement laser en présence d'oxygène produisait de grandes quantités d'oxygène singulet, non par une réaction chimique mais par un transfert d'énergie.

Kamat et coll. (1998) ont effectué des observations similaires en recourant aux microsomes de foie de rat. En présence d'irradiation (UV ou visible), le C_{60} (complexé par la

cyclodextrine) induit des dommages oxydants (peroxydation lipidique, dégradations protéiques), probablement, selon les auteurs, par l'intermédiaire de la formation d'un radical oxygène singulet ; cette action peut être modulée par les antioxydants naturellement présents dans l'organisme. Pour Yamakoshi et coll. (1999, 2003), les agents actifs sont en réalité le radical hydroxyle et l'anion radical oxygène, eux-mêmes formés par transfert à partir de l'anion radical C_{60} et non l'oxygène singulet. En l'absence d'irradiation lumineuse, le $C_{60}^{\bullet-}$ présente au contraire des propriétés antioxydantes (Wang et coll., 1999).

| Cytotoxicité

L'insolubilité du fullérène est l'une des principales difficultés pour l'étude de sa cytotoxicité. Pour la contourner, Moussa (1995) a fait phagocyter du C_{60} par des polynucléaires neutrophiles humains. La phagocytose a été confirmée par examen au microscope électronique. Le C_{60} était agrégé sous forme de grains de 1 à 100 μm de diamètre (20 % < 1 μm). La mortalité cellulaire n'était pas modifiée, ce que confirmait un dosage de la LDH (marqueur de cytolysse). Scrivens et coll. (1994) avaient obtenu des résultats similaires avec des cellules de peau humaine et du fullérène C_{60} radiomarqué. Jia et coll. (2005) n'ont également pas observé de cytotoxicité, en utilisant des cultures de macrophages alvéolaires de cobaye. Porter et coll. (2006) ont montré que le C_{60} se répartissait en différents endroits de la cellule, notamment le noyau.

D'autres contournent cette difficulté en utilisant la propriété du C_{60} de former des complexes avec la polyvinylpyrrolidinone (Yamakoshi et coll., 1999 ; Ungurenasu et Airinei, 2000) ou encore la cyclodextrine (Kamat et coll., 1998).

Adelmann (1994, résumé dans Warheit et coll., 2004) a exposé des macrophages alvéolaires humains pendant 4 et 20 heures à des fullérènes C_{60} et C_{60-70} . Il rapporte une diminution de leur viabilité, ainsi que l'augmentation de trois cytokines, marqueurs d'inflammation (TNF- α , interleukines 6 et 8).

Baierl et coll. (1996) ont étudié l'effet de fullérènes sur des cultures de cellules alvéolaires de bovins. Deux types de fullérènes ont été testés : le C_{60} pur, et une suie produite à l'arc électrique, contenant 10 % de fullérène C_{60} et des traces d'autres fullérènes. Aucun effet cytotoxique n'a été montré après 48 heures d'incubation avec le C_{60} , ni dommage lysosomal, ni production d'espèces activées de l'oxygène.

Pour Gharbi et coll. (2005), le C_{60} est dépourvu de toxicité aiguë ou subaiguë sur le rongeur, et même un excellent protecteur contre les effets de radicaux libres formés au niveau hépatique après intoxication aiguë au chloroforme.

Radomski et coll. (2005) ont étudié *in vitro* l'agrégation de plaquettes sanguines humaines en présence de nanotubes de carbone (monofeuillet – NTU – ou multifeuillet – NTP), de fullérène C_{60} , d'un mélange de particules issues de sources de combustion

(NCM), ou encore de particules urbaines type (PUT, taille moyenne 1,4 μm). Toutes ces particules favorisaient l'agrégation plaquettaire ($\text{NCM} \geq \text{NTU} > \text{NTP} > \text{PUT}$), à l'exception du fullérène C_{60} .

Pour Isakovic et coll. (2006), le n- C_{60} est fortement cytotoxique sur diverses lignées cellulaires ; il induit rapidement une nécrose, et non une apoptose. Ces effets semblent liés à la production directe d'espèces activées de l'oxygène. Selon Fiorito et coll. (2006), de tels résultats pourraient être explicables par la présence d'impuretés, notamment métaux ou graphite résiduels, le produit purifié se révélant très faiblement toxique (*in vitro*, macrophages humains et murins).

| Mutagénicité

Sera et coll. (1996) ont testé la mutagénicité du fullérène C_{60} (pur à plus de 99,9 %) sur *Salmonella* TA 102, 104 et YG 3003 (mutante de TA102), en absence et en présence de fraction S9. Insoluble dans l'eau et le DMSO, le fullérène a été dissous dans du polyvinylpyrrolidone (PVP).

Sur la souche TA 102, le produit ne s'est pas avéré mutagène, avec ou sans activation métabolique, sauf lorsque la préparation a été irradiée par une lumière visible. La mutagénicité était alors dose-dépendante et fonction de la durée d'irradiation.

Les mêmes résultats ont été trouvés pour la souche YG 3003, et plus faiblement pour la souche 104. Zakharenko et coll. (1997) n'ont pas mis de génotoxicité en évidence sur la souche *Escherichia coli* PQ37.

Le C_{60} « micronisé » n'affecte pas la croissance microbienne (concentration : 43,2 $\mu\text{g/ml}$; Chiron et coll., 2000).

Mori et coll. (2006) ont pratiqué le test d'Ames sur plusieurs souches de *Salmonella typhimurium* (TA100, TA1535, TA98, TA1537) et une d'*Escherichia coli*, avec et sans activation métabolique, à 9 niveaux de doses (jusqu'à 5 000 $\mu\text{g/plaque}$). Un test d'aberration chromosomique a également été pratiqué (sur cellules pulmonaires de hamster chinois). Tous les résultats sont négatifs.

3.5.2. Distribution et devenir dans l'organisme

De nombreuses études ont été réalisées sur le métabolisme de dérivés du fullérène, mais peu pour le fullérène lui-même. Moussa et coll. (1996) ont injecté du fullérène C_{60} par voie intrapéritonéale (4 à 5 g/kg de poids corporel) à des souris Swiss. Le foie et la rate des animaux présentaient une couleur brune, identique à celle du produit injecté. Les cellules de Küpffer et les cellules péricapillaires contenaient des agrégats bruns, seuls quelques grains étaient présents dans les hépatocytes. Des grains ont été retrouvés

également dans les cellules réticuloendothéliales de la rate, des poumons, du cœur, des reins. Aucun dépôt n'a été détecté dans le cerveau.

En revanche, Eva Oberdörster (2004) a exposé de jeunes poissons (achigan à grande bouche, ou perche noire d'Amérique, *Micropterus salmoides*) à une suspension aqueuse colloïdale de 0,5 ppm de fullérène (C₆₀) non recouvert. Une peroxydation lipidique notable (17 fois supérieure à celle chez les témoins, $p < 0,01$) a été observée (par réaction avec l'acide thiobarbiturique) dans les cerveaux des poissons exposés pendant 48 heures ; il y a stress oxydant et déplétion en glutathion, comme l'avaient déjà montré Li et coll. (2003) sur macrophages et cellules épithéliales. Le mécanisme de cet effet reste à découvrir.

Ces travaux ont été partiellement complétés (Oberdörster et coll., 2005) sur des poissons mâles adultes (ménés tête de boule, *Pimephales promelas*), avec du fullérène C₆₀ non traité, ou des nanotubes de carbone monofeuillet, non traités ou recouverts d'un peptide synthétique. Ces derniers seulement ont été retrouvés dans les branchies. Aucune mortalité n'a été observée à 48 heures. Des analyses plus poussées doivent compléter ce travail préliminaire, rapporté en quelques lignes.

Zhu et coll. (2006) ont comparé, sur la daphnie et *Pimephales promelas* (ou méné tête de boule), les toxicités du C₆₀ solubilisé soit dans le tétrahydrofuranne (THF) puis l'évaporation de ce dernier en présence d'eau, soit après une agitation mécanique prolongée (plusieurs semaines) dans l'eau pure, technique supposée plus proche des conditions environnementales. Dans les deux cas, la toxicité du C₆₀ préparé par la voie du THF s'est montré nettement plus importante, ce qui met en évidence ce fait important : la méthode de préparation du nC₆₀ peut influencer sa toxicité.

Ce constat est largement étayé par Andrievsky et coll. (2005), qui se réclament d'une longue expérience avec ces composés pour mettre en question les conclusions des travaux précédents, dans lesquels, selon eux, les effets constatés (par des scientifiques comme Oberdörster, Colvin ou encore Deguchi) seraient essentiellement attribuables à la présence résiduelle de tétrahydrofuranne retenu, observation dont la pertinence semble reconnue par Oberdörster et coll. (2006).

3.5.3. Toxicité générale

Le fullérène (mélange de C₆₀ et C₇₀, pureté annoncée 99,5 %) a été administré p.o. en dose unique à 5 rats Sprague-Dawley de chaque sexe à raison de 2 000 mg/kg dans une solution à 0,5 % de carboxyméthylcellulose (sel de sodium) additionnée de 0,1 % de Tween 80. Aucun signe clinique ni aucune modification pondérale n'ont été observés sur 14 jours (Mori et coll., 2006). En raison de résultats de mutagenèse également négatifs, les auteurs concluent que ces fullérènes n'ont pas de propriétés toxicologiques marquantes.

3.5.4. Toxicité locale

| Toxicité oculaire

Une étude sur le lapin a été effectuée en s'inspirant, d'après les auteurs, du test de Draize. Quatre lapins albinos ont reçu dans chaque œil 0,2 ml d'une suspension aqueuse de produit (formulation non précisée). Aucune anomalie n'a été notée après 72 heures (Huczko, 1999).

| Toxicité cutanée

Huczko et coll. (1999) ont appliqué des patch-tests (filtre papier saturé avec une suspension aqueuse de suies de fullérène) sur 30 volontaires qui présentaient des irritations variées ou des susceptibilités allergiques. Aucun effet n'a été observé à 96 heures.

| Toxicité pulmonaire

Différentes doses de fullérènes, produits soit par arc électrique (7 % de fullérènes) soit par combustion (98 % de fullérènes), ont été administrées à des souris CAF1/J par instillation intratrachéale (100 ou 250 µg par souris, en suspension dans 50 µl de soluté physiologique à 1 % de DMSO ; Quan et coll., 2005). Mesurés à 24 heures après instillation, le recrutement cellulaire et les protéines totales étaient élevés dans le LLBA, d'ailleurs sans différence notable entre les deux échantillons. Cette étude n'est rapportée qu'en quelques lignes.

3.5.5. Antigénicité

Chen et coll. (1998) ont observé, chez la souris, la production d'anticorps (IgG) anti-fullérène après sensibilisation par un dérivé du C₆₀ conjugué à la thyroglobuline bovine. La population d'anticorps formés recelait une sous-population réactive au C₆₀. Ces anticorps ont été étudiés plus en détail par d'autres équipes (Braden et coll., 2000).

3.5.6. Études sur la reproduction

Une seule étude de reprotoxicité a été publiée (Tsuchiya et coll., 1996). Par voie intrapéritonéale, les auteurs ont injecté à deux souris SLC gestantes (à 10 jours) une solution de C₆₀ pur dans de la polyvinylpyrrolidone (PVP), ainsi que de la PVP ou de l'eau distillée dans le groupe témoin. Les embryons ont été examinés 18 heures après administration.

Les résultats sont les suivants :

- morts et malformations de tous les embryons traités avec 137 mg/kg de C₆₀. À 50 mg/kg, on retrouve également des malformations, principalement au niveau de la tête et de la queue. À 25 mg/kg, un seul embryon a montré des malformations ;
- les groupes traités par de l'eau (25 ml/kg) et de la PVP (18 g/kg) n'ont pas montré d'anomalies.

Les auteurs ont également trouvé des effets sérieux pour le groupe exposé à 50 mg/kg au niveau du sac vitellin, avec un rétrécissement des membranes et des vaisseaux sanguins. Les effets sur l'embryon ont pu résulter indirectement de ces anomalies de vascularisation. L'article ne précise pas si des effets toxiques étaient observés chez les mères.

S'agissant d'une étude menée par voie intrapéritonéale, l'interprétation des résultats doit être faite avec précaution.

3.5.7. Cancérogénicité

Une seule étude de cancérogenèse par voie cutanée a été publiée (Nelson et coll., 1993). Une semaine après application cutanée sur des souris femelles CD1 âgées de 6 à 7 semaines soit d'un initiateur (7,12-diméthylbenzo[a]anthracène, 20 nM dans 200 µL d'acétone) soit d'un promoteur (5 µg d'acétate de tétradécanoyle phorbol [TPA] dans 200 µL d'acétone), 200 µg de fullérènes (6 molécules de C₆₀ pour une molécule de C₇₀) dans 200 µL de benzène ont été appliqués deux fois par semaine pendant 24 semaines. Aucune tumeur n'a été observée (à l'exception de tumeurs bénignes après application du TPA). Une autre expérimentation rapportée dans le même article n'a pas mis en évidence une synthèse non programmée d'ADN au niveau de l'épiderme 72 heures après une application unique du mélange de fullérènes (d'après l'auteur, les promoteurs tumoraux entraînent généralement une augmentation de la synthèse d'ADN). Cette étude, menée dans des conditions d'exposition aiguë ou subaiguë, est de portée trop limitée pour conclure à la non-cancérogénicité à long terme des fullérènes (HSE, 2004).

Commentaires

Le fullérène C₆₀ a fait l'objet de quelques études toxicologiques non classiques. Contrairement à certains de ses dérivés, l'absorption du C₆₀ par voie cutanée, digestive ou pulmonaire n'a pas été étudiée chez l'animal. Par ailleurs, selon Hood (2004), les fullérènes sont généralement traités en surface pour en réduire la toxicité, mais on ignore si et comment cela pourrait influencer sur leur toxicité, et combien de temps ce traitement

tient quand la molécule est exposée dans les milieux biologiques ou dans l'environnement. Il semble en fait que les auteurs qui parlent de ces traitements désignent en réalité une modification de la molécule par greffage de groupements chimiques, il ne s'agirait donc plus dans ce cas du C_{60} .

La distribution dans l'organisme a été étudiée chez la souris. Le fullérène est réparti pratiquement dans tout l'organisme (foie, rate, poumons, cœur, muscles, système réticulo-endothélial). Aucune étude de cinétique ou de bio-accumulation n'a été publiée.

Le fullérène n'est pas cytotoxique sur plusieurs types de cellules animales ou humaines mises en culture. Seul Adelman semble montrer des résultats inverses, mais nous n'avons pu obtenir cette publication, citée dans un article (Warheit et coll., 2004).

Une seule étude de mutagénicité a été retrouvée dans la littérature anglo-saxonne (Sera et coll., 1996). Elle montre que le C_{60} est mutagène sur *Salmonella*, uniquement en cas de photo-irradiation, mais elle n'a pas été effectuée selon les standards actuels.

Des tests d'irritation sur l'œil et la peau ont été effectués pour le C_{60} selon des méthodologies non conventionnelles. Les résultats sont négatifs.

Une seule étude de tératogénicité montre des malformations induites par du C_{60} . La méthode utilisée, non normalisée, et la voie d'exposition, critiquable, ne permettent pas de retenir ces résultats. Une étude de cancérogénicité par voie cutanée a été réalisée selon une méthodologie non normalisée et un temps d'observation court. Les résultats sont négatifs.

Aucune donnée n'existe concernant l'homme.

Le fullérène C_{60} s'avère donc très insuffisamment étudié sur le plan toxicologique. Il serait utile de compléter les données sur le métabolisme par des études des voies de pénétration (cutanée, pulmonaire, orale), et de cinétique (élimination et accumulation potentielle).

Les études de génotoxicité doivent être complétées.

Des études de toxicité chronique doivent être lancées par les différentes voies d'exposition prévisibles (orale, cutanée, pulmonaire). Des études sur la reproduction sont nécessaires ainsi que des études de cancérogénicité. Il est notamment indispensable d'effectuer des études par inhalation, aucune information n'étant disponible pour cette voie.

Enfin, les difficultés de préparation et de caractérisation fine des échantillons testés doivent être résolues sans ambiguïté pour connaître exactement ce qui fait l'objet de l'essai et appuyer l'interprétation sur des données physicochimiques incontestables (Lovern et coll., 2006 ; Andrievsky et coll., 2005 ; Fiorito et coll., 2006 ; Oberdörster et coll., 2006).

Bibliographie

- Andrievsky G, Klochkov V, Derevyanchenko L (2005). Is the C₆₀ Fullerene Molecule Toxic? *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures* **13**(4) 363-376.
- Arbogast JW, Darmanyan AP, Foote CS, Rubin Y, Diederich FN, Alvarez MM, Anz S, Whetten RL (1991) Photophysical properties of sixty atom carbon molecule (C₆₀). *J Phys Chem* **95**, 11-12.
- Baierl T, Drosselmeyer E, Seidel A, Hippeli S (1996). Comparison of immunological effects of fullerene C₆₀ and raw soot from fullerene production on alveolar macrophages and macrophage like cells *in vitro*. *Exp Toxic Pathol* **48**, 508-511.
- Bernier P, Almairac R, Firlej L (1997). Fullérènes et nanotubes de carbone. De l'élaboration aux études physiques. 81-83. In : *Les fullérènes*, CNRS, département de chimie, Paris, juin 1997, 93 pages.
- Birkett (2001). Fullerenes. *Annual Rep Prog Chem, Sect. A*, **97**, 417-442.
- Bosi S, Da Ros T, Spalluto G, Prato M (2003). Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur J Med Chem* **38**(11-12) 913-923.
- Braden BC, Goldbaum FA, Chen BX, Kirschner AN, Wilson SR, Erlanger BF (2000). X-ray crystal structure of an anti-Buckminsterfullerene antibody Fab fragment: Biomolecular recognition of C₆₀. *Proc Nat Acad Sci* **97**(22) 12193-12197.
- Brant J, Lecoanet H, Hotze M, Wiesner M (2005). Comparison of electrokinetic properties of colloidal fullerenes (n-C₆₀) formed using two procedures. *Environ Sci Technol* **39**(17) 6343-6351.
- Chen BX, Wilson SR, Das M, Coughlin DJ, Erlanger BF (1998). Antigenicity of fullerenes: Antibodies specific for fullerenes and their characteristics. *Immunology* **95**(18) 10809-10813.
- Chiron JP, Lamande J, Moussa F, Trivin F, Ceolin R (2000). [Effect of "micronized" C₆₀ fullerene on the microbial growth in vitro]. *Ann Pharm Fr* 58(3) 170-175. [Article en français]
- Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Bernier P (2006). Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon* **44**(6) 1100-1105.
- Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM, Alemany LB, Tao YJ, Guo W, Ausman KD, Colvin VL, Hughes JB (2005). C₆₀ in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol* **39**(11) 4307-4316.
- Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F (2005). [60]fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett* **5**(12) 2578-2585.
- Gross M (1997). Propriétés rédox de fullérènes C₆₀ fonctionnalisés, 18-21. In : *Les fullérènes*, CNRS, département de chimie, Paris, juin 1997, 93 pages.
- Holister P, Roman Vas C, Harper T (2003). Fullerenes. *Technology White Papers* nr. 7, Cientifica, Madrid, 12 pages.
- Hood E (2004). Fullerenes and Fish Brains. Nanomaterials Cause Oxidative Stress. *Environ Health Perspect* **112**, A568.

- HSE (2004). A review of the toxicity of particles that are intentionally produced for use in nanotechnology applications, seen from an occupational health perspective. Health and Safety Executive, Industrial Chemicals Unit, July 2004, 41 pages.
- Huczko A, Lange H, Calko E (1999). Fullerenes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Full Sci Techn* **7(5)** 935-39.
- Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Mirkovic M, Dramicanin M, Harhaji L, Raicevic N, Nikolic Z, Trajkovic V (2006). Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. *Toxicol Sci*. **91(1)** 173-183.
- Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, Pei R, Yan T, Zhao Y, Guo X (2005). Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol* **39**, 1378-1383.
- Kamat JP, Devasagayam TP, Priyadarsini KI, Mohan H, Mittal JP (1998). Oxidative damage induced by the fullerene C₆₀ on photosensitization in rat liver microsomes. *Chem Biol Interact* **114(3)** 145-159.
- Kroto H (1997) Le buckminsterfullérène C₆₀ : plus qu'une jolie molécule, 7-8. In : *Les fullérènes*, CNRS, département de chimie, Paris, juin 1997, 93 pages.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* **111(4)** 455-460.
- Lovern SB, Klaper R (2006). *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* **25**, 1132-1137.
- Mathis C, Ederlé Y, Nuffer R (1997). Greffage de polymère sur le C₆₀, 22-25. In : *Les fullérènes*, CNRS, département de chimie, Paris, juin 1997, 93 pages.
- Mori T, Takada H, Ito S, Matsubayashi K, Miwa N, Sawaguchi T (2006). Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis. *Toxicology* **225(1)** 48-54.
- Moussa F (2004). Perspectives thérapeutiques des fullérènes, séminaire de l'UMR CNRS 8612, 9 sept 2004.
- Moussa F, Chretien P, Dubois P, Chuniaud L, Dessante M, Trivin P, Sizaret PY, Agafonov V, Ceolin R, Szwarc H, Greugny V, Fabre C, Rassat A (1995). The influence of C₆₀ powders on cultured human leukocytes. *Full Sci Techn* **3(3)** 333-42.
- Moussa F, Trivin F, Ceolin R, Hadchouel M, Sizaret PY, Greugny V, Fabre C, Rassat A, Szwarc H (1996). Early effects of C₆₀ administration in Swiss mice : a preliminary account for *in vivo* C₆₀ toxicity. *Full Sci Techn* **4(1)** 21-29.
- Nakajima N, Nishi C, Li FM, Ikada Y (1996). Photo-induced cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Fuller Sci Technol* **4**, 1-19.
- Nelson MA, Domann FE, Bowden GT, Hooser SB, Fernando Q, Carter DE (1993). Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin. *Toxicol Ind Health* **9(4)** 623-630.
- Oberdörster E, Ortiz-Acevedo A, Xie H, Pantano P, Baughman RH, Musselman IH, Draper RK, Dieckmann GR (2005). Exposure of fathead minnow to fullerene and single-walled nanotubes. *Toxicologist*, résumé n° 1594 (page 325).

- Oberdörster E (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect* **112**(10) 1058-1062.
- Oberdörster E, Zhu S, Blickley TM, McClellan-Green P, Haasch ML (2006). Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms. *Carbon* **44**(6) 1112-1120.
- Porter AE, Muller K, Skepper J, Midgley P, Welland M (2006). Uptake of C₆₀ by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomater* **2**(4) 409-419.
- Quan C, Wilson S, Chen L (2005). Toxicities of nanomaterials. *Toxicologist*, résumé n° 1037 (page 211).
- Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, Radomski MW (2005). Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol* **146**(6) 882-893.
- Rancan F, Rosan S, Boehm F, Cantrell A, Brellreich M, Schönberger H, Hirsch A, Moussa F (2002). Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C₆₀ mono-adduct and a malonic acid C₆₀ tris-adduct on jurkat cells. *J Photochem Photobiol B* **67**(3) 157-162.
- Rassat A, Fabre C, Greugny-Le Boulair, Marx L, Roux S (1997) Symétrie et fullérènes, 12-17. In : *Les fullérènes*, CNRS, département de chimie, Paris, juin 1997, 93 pages.
- Saito Y, Ohta H, Jinno K (2004). Chromatographic separation of fullerenes. *Anal Chem* 267A-272A.
- Sayes CM, Mendez J, Ausman KD, West JL, Hafner JH, Colvin VL (2005a). The bio-nano interface: examining the interactions between water soluble fullerenes and biological membranes. *Toxicologist*, résumé n° 1862 (page 380).
- Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, Beach JM, Moore VC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausman KD, Colvin VL (2005b). Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*. *Toxicol Lett*. 2005 Oct 13; [Epub ahead of print]
- Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Boyd AM, Ausman KD, Tao YJ, Sitharaman B, Wilson LJ, Hughes JB, West JL, Colvin VL (2004). The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes. *Nano Lett* **4**, 1881.
- Scrivens WA, Tour JM, Creek KE, Pirisi L (1994). Synthesis of ¹⁴C-Labeled C₆₀, its Suspension in Water, and its Uptake by Human Keratinocytes. *J Am Chem Soc* **116**(10) 4517-4518.
- Sera N, Tokiwa H, Miyata N (1996). Mutagenicity of the fullerene C₆₀-generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides. *Carcinogenesis* **17**(10) 2163-169.
- Su DS, Müller JO, Jetoft RE, Rothe D, Jacob E, Schlögl R (2004). Fullerene-like Soot from EURO-IV Diesel Engine: Consequences for Catalytic Automotive Pollution Control. *Topics in Catalysis*, 241-245.
- Tokuyama H, Yamago S, Nakamura E (1993). Photoinduced biochemical activity of fullerene carboxylic acid. *J Am Chem Soc* **115**, 7918-7919.
- Tsuchiya T, Yamakoshi YN, Miyata N (1995). A novel promoting action of fullerene C₆₀ on the chondrogenesis in rat embryonic limb bud cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun* **206**(3) 885-894.

- Tsuchiya T, Oguri I, Nakajima Yamakoshi YN, Miyata N (1996). Novel harmful effects of [60]fullerene on mouse embryos in vitro and *in vivo*. *FEBS Lett* **393**(1) 139-145.
- Ungurenasu C, Airinei A (2000). Highly stable C(60)/poly(vinylpyrrolidone) charge-transfer complexes afford new predictions for biological applications of underivatized fullerenes. *J Med Chem* **43**(16) 3186-3188.
- Wang IC, Tai LA, Lee DD, Kanakamma PP, Shen CK, Luh TY, Cheng CH, Hwang KC (1999). C(60) and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation. *J Med Chem* **42**(22) 4614-4620.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR (2004). Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* **77**(1) 117-125.
- Yamakoshi Y, Sueyoshi S, Miyata N (1999). [Biological activity of photoexcited fullerene]. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku* (**117**) 50-60. [Article en japonais]
- Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T (2003). Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C60) as potential medicines: O₂-* versus 1O₂. *J Am Chem Soc* **125**(42) 12803-9.
- Yang XL, Fan CH, Zhu HS (2002). Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C₆₀]fullerene derivatives and its mechanism. *Toxicol In Vitro* **16**(1) 41-46.
- Zakharenko LP, Zakharov IK, Vasiunina EA, Karamysheva TV, Danilenko AM, Nikiforov AA (1997). [Determination of the genotoxicity of fullerene C60 and fullerol using the method of somatic mosaics on cells of *Drosophila melanogaster* wing and SOS-chromotest]. *Genetika* **33**(3) 405-409. [Article en russe]
- Zhu S, Oberdorster E, Haasch ML (2006). Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C(60)) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow. *Mar Environ Res.* **62** (Suppl.), S5-S9.

4. Nanotubes de carbone

D. Lafon

Bien que leur existence soit déjà connue du grand public en raison de toutes les applications envisagées, ou parfois réalisées, les dangers pour la santé des nanotubes eux-mêmes ou de leurs dérivés (dont la variété potentielle est infinie) n'ont été que très peu étudiés. Ce chapitre fait le point des publications que nous avons pu trouver, parfois extrêmement sommaires, pour les nanotubes eux-mêmes ; leurs dérivés ont en général des propriétés très différentes, fonction du type et du nombre des groupements ajoutés (Sayes et coll., 2005). Nul doute que les données évolueront rapidement, mais qu'elles sont encore largement insuffisantes pour évaluer les risques encourus suite à une exposition à ces entités.

4.1. Nature, production, utilisations

En 1991, Sumio Ijima trouve des nanotubes de carbone sur la cathode d'un appareil à arc à électrodes de carbone utilisé pour obtenir des fullérènes. Ces nanotubes étaient formés de cylindres concentriques de graphite (de 2 à 50 tubes emboîtés), de diamètre minimal 2,2 nm, et de longueur pouvant atteindre 1 mm. Les tubes étaient généralement fermés par un cône ou un dôme (figure 6.3).

Le nombre de tubes emboîtés peut être réduit à un tube unique (« nanotube monofeuillet »), que l'on peut obtenir directement par réaction à 1 000 °C entre le monoxyde de carbone et le fer pentacarbonyle (Birkett, 2001). Les productions en petite quantité, par la méthode dite de l'arc électrique ou par ablation laser, sont utilisées pour la recherche. Commercialement, les nanotubes sont fabriqués à haute température par décomposition catalytique en phase gazeuse d'hydrocarbures de faibles masses moléculaires, ou de monoxyde de carbone sous haute pression (procédé HiPCO). Le diamètre extérieur du tube plurifeuillet est d'approximativement 10 à 15 nanomètres (monofeuillet : 0,7 à 3 nm), pour un diamètre interne de 5 nanomètres, et une longueur de quelques dizaines de micromètres (10 à 200 nm, tubes monofeuillets ; Feigenbaum et coll., 2004 ; Donaldson et coll., 2006). Leur surface spécifique peut dépasser les 1 000 m²/g, mais l'agglomération réduit cette valeur à quelques centaines de m²/g, ce qui reste élevé.

Naturellement, le diamètre des tubes dépend du nombre de feuillets, du nanotube monofeuillet (NTU) aux tubes à deux feuillets (NTD) ou plus (NTP). Leurs caractéristiques

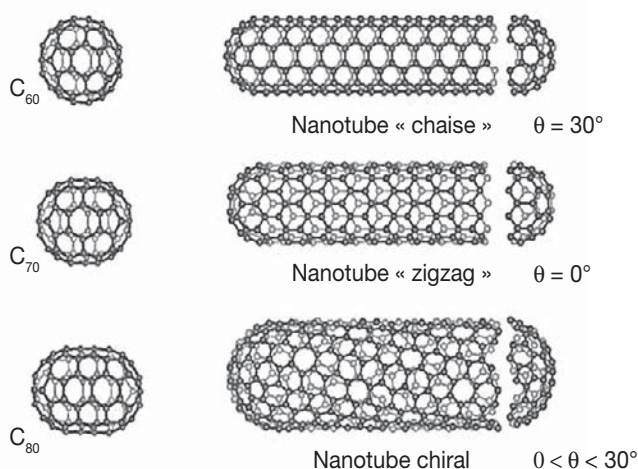


Figure 6.3. Différents types de fullérènes (à gauche) et de nanotubes de carbone monofeuillet. (D'après <http://www.imp.cnrs.fr/utilisateurs/guillard/page3.html>)

physicochimiques sont liées à leurs modes de préparation (notamment catalyseurs) et de purification. Le taux de métaux résiduels (parmi lesquels Co, Fe, Ni et Mo) peut atteindre 50 %, mais peut être, selon le procédé de fabrication et le degré de purification, inférieur à 1 %.

Les nanotubes s'agrègent spontanément par centaines, y compris dans l'eau (Cheng et Cheng, 2005). Ils répondent à la définition des fibres (l'OMS définit une fibre par une longueur [L] supérieure à 5 µm, un diamètre [D] inférieur à 3 µm, et un rapport L/D supérieur à 3). Ils possèdent une conductivité électrique hors pair et une résistance mécanique importante.

Les principaux débouchés industriels à l'étude sont la microélectronique, le stockage de l'énergie, les composites, la nanofiltration, les usages médicaux.

4.2. Toxicité *in vitro*

Shvedova et coll. (2003) ont montré une augmentation de la production de radicaux libres (hydroxyles) et une diminution de la viabilité cellulaire lors de l'introduction de nanotubes monofeuillet (NTU) pendant 18 heures dans des cultures de kératinocytes humains. L'addition d'un chélateur de métaux supprimait la production de radicaux libres et améliorait la viabilité cellulaire.

Toujours sur cellules humaines en culture (cellules humaines de leucémies promyélocytiques HL60), Shi Kam et coll. (2004) ont montré que des nanotubes rendus fluorescents étaient internalisés. Sur cellules épithéliales bronchiques exposées pendant 18 heures à 0,06, 0,12 ou 0,24 mg/ml de nanotubes monofeuillet, Keshava et coll. (2004) ont observé la modification de l'expression de divers gènes, dont certains impliqués dans le métabolisme (CYP1B1 par exemple) ou le contrôle du cycle cellulaire.

La même équipe (Kisin et coll., 2004) a mis en évidence, sur une lignée immortalisée de kératinocytes de l'épiderme humain (HaCaT) et sur cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B) des modifications ultra-structurelles et morphologiques en présence de NTU (exposition de 18 heures). Le stress oxydant et la toxicité cellulaire étaient constatés par la formation de radicaux hydroxyle, l'accumulation de produits de peroxydation, la déplétion en antioxydants, la diminution de la viabilité cellulaire, et enfin l'apoptose.

Utilisant le même type de culture, Monteiro-Riviere et coll. (2005a) ont confirmé par microscopie électronique la présence de nanotubes multifeuillets dans le cytoplasme de kératinocytes humains après des expositions de 1 heure à 48 heures ; 59 % des cellules contenaient des particules à 24 h, 84 % à 48 heures. La viabilité cellulaire diminuait légèrement, de manière dose dépendante, et la concentration d'interleukine-8 augmentait de manière proportionnelle à la durée d'exposition. Un essai de type similaire, toujours avec des NTU, a montré un stress oxydant et une inhibition de la prolifération des kératinocytes, ainsi qu'une activation dose-dépendante de NF-κB (Manna et coll., 2005).

Cui et coll. (2005) ont montré, sur cellules de peau humaine (HEK293), que des NTU induisaient un arrêt du cycle cellulaire (en G1) et diminuaient l'expression de gènes codant pour des protéines de l'adhérence cellulaire. Jia et coll. (2005) ont confirmé la cytotoxicité de NTU et NTP sur des macrophages alvéolaires de cobaye ; les nanotubes monofeuillet étaient les plus toxiques (à concentrations massiques égales).

In vitro, les nanotubes sont donc phagocytés et peuvent déclencher des mécanismes précurseurs d'inflammation. Donaldson et coll. (2006) insistent sur le fait que les plus petits nanotubes isolés peuvent, du fait de leur taille, passer inaperçus et éviter la phagocytose.

Potapovich et coll. (2005) ont incubé des macrophages murins RAW 264.7 en présence de nanotubes de carbone monofeuillet (NTU) recelant différents niveaux de fer (non purifiés, ces tubes peuvent accuser jusque 40 % en masse de Fe). Les macrophages internalisaient les nanotubes (microscopie électronique à transmission) et, à niveau de fer élevé, l'anion radical oxygène était efficacement converti en radical hydroxyle. Les deux types de nanotubes (purifiés ou non purifiés du fer) induisaient l'émission de cytokines IL-6 (pro-inflammatoire) et TGF- β (fibrogène).

Pour leur part, Monteiro-Riviere et coll. (2005b) ont exposé des kératinocytes humains à des nanotubes multifeuillets et analysé le protéome. L'expression de 22 protéines était significativement ($p < 0,05$) altérée (dont 15 renforcée), ce qui semblait indiquer des troubles dans de nombreux systèmes de régulation cellulaire. Cette étude, rapportée en quelques lignes, sera sans doute publiée sous forme plus détaillée.

Bottini et coll. (2005) ont mis en évidence une apoptose de lymphocytes T en fonction de la dose et de la durée d'exposition à des nanotubes multifeuillets ; ils recommandent que les concentrations utilisées soient nettement inférieures à 40 $\mu\text{g/ml}$ pour limiter ce phénomène. Les nanotubes oxydés étaient plus nettement toxiques que les non oxydés (Bottini et coll., 2006).

Radomski et coll. (2005) ont étudié *in vitro* les effets sur l'agrégation de plaquettes sanguines humaines de la présence de nanotubes de carbone (monofeuillet – NTU – ou multifeuillets – NTP), de fullérène C_{60} , d'un mélange de particules issues de sources de combustion (NCM), ou encore de particules urbaines typiques (PUT, taille moyenne 1,4 μm). Toutes ces particules favorisaient l'agrégation plaquettaire (NCM $\geq$ NTU $>$ NTP $>$ PUT), à l'exception du fullérène C_{60} et accéléraient l'apparition de thromboses (induites par le chlorure ferrique) dans la carotide du rat.

Dans leur étude de cytotoxicité comparée de nanoparticules variées de tailles primaires de 3 à 150 nm (sauf pour des NTP aggrégés, dont la longueur pouvait dépasser 15 μm) sur macrophage pulmonaire murin, Soto et coll. (2005) soulignent que les NTP présentaient une toxicité comparable à celle de fibres d'amiante chrysotile. Ils se posent, logiquement, la question des effets potentiels sur la santé, particulièrement à long terme.

Salvador-Morales et coll. (2006) ont étudié l'activation du complément par, et l'interaction d'autres protéines plasmatiques avec, des nanotubes mono- ou multi-feuillets. Ils concluent que l'activation du complément est cohérente avec l'effet adjuvant et peut favoriser les dommages consécutifs à une activation excessive, tels que réactions inflammatoires et formation de granulomes. Le nombre de protéines se liant aux nanotubes est réduit : le C1q pour le complément, et le fibrinogène et les apolipoprotéines AI, AIV et CIII du plasma.

Note. Le complément fait partie du système de défense immunitaire de l'organisme. C'est un groupe d'environ 35 protéines présentes dans le sang, solubles ou fixées à des parois cellulaires, qui se fixent à des micro-organismes, cellules endommagées ou mortes, et autres particules étrangères à l'organisme, et les éliminent. Trois voies d'activation sont connues ; dans la voie dite « classique », la protéine C1q reconnaît comme étrangères des entités grâce à leurs charges de surface et leur caractère hydrophobe. On parle d'un « effet adjuvant » lors du renforcement de la réponse immunitaire aux corps étrangers.

Inversement, Chlopek et coll. (2006) affirment l'excellente biocompatibilité de nanotubes multifeuillet hautement purifiés, sur fibroblastes et ostéoblastes *in vitro*. Cette compatibilité est également bonne, pour des nanotubes monofeuillet fortement purifiés, vis-à-vis de cardiomyocytes ; une possible action à long terme résulterait plutôt de facteurs physiques que d'interactions chimiques (Garibaldi et coll., 2006). Le comportement en situation réelle des nanotubes, à l'origine de la formation ou de la capture de radicaux libres selon les conditions expérimentales et les publications, reste à approfondir (Fenoglio et coll., 2006). Il se pourrait que les divergences d'appréciation soient dues aux impuretés, notamment métaux et graphite résiduels (Fiorito et coll., 2006) et/ou différentes méthodes de préparation (Donaldson et coll., 2006).

4.3. Toxicité cutanée et oculaire

Huczko et coll. (2001a) ont testé des nanotubes de carbone dans deux expériences. La première a été menée sur 40 volontaires, qui présentaient des irritations et une susceptibilité allergique, à qui a été appliqué un patch-test saturé d'une suie contenant des nanotubes (surtout NTU). Aucune réaction n'a été observée après 4 jours. Le temps d'application des patches, les concentrations en nanotubes, les méthodes d'observation ne sont pas précisées. La seconde expérience a consisté à instiller dans l'œil de 4 lapins albinos une suspension aqueuse contenant des suies. Les lapins ont été observés à 24, 48 et 72 heures. Aucune anomalie n'a été observée ; aucun renseignement précis n'est donné sur la méthode d'instillation ou sur les techniques d'observation des lésions.

4.4. Toxicité pulmonaire

Huczko et coll. (2001b) ont instillé par voie intratrachéale à des cobayes Dunkin Hartley mâles des suies d'arc électrique contenant des nanotubes de carbone. Des animaux témoins ont reçu des suies sans nanotubes. Quatre semaines après l'injection, des tests fonctionnels pulmonaires ont été effectués, puis les animaux sacrifiés pour un lavage bronchopulmonaire. Les mesures des fonctions pulmonaires (volume courant, fréquence respiratoire, résistance pulmonaire) ne montraient pas de différences entre les groupes, mais aucun test statistique n'est présenté. Les cellules du liquide de lavage broncho-alvéolaire n'indiquaient également pas de différence entre les groupes. Là aussi, il n'y a aucun calcul statistique.

La description de cette étude est très sommaire ; il n'est notamment jamais précisé le nombre d'animaux utilisés, et le choix de suie comme substance négative peut paraître critiquable. Il est donc difficile de tirer des enseignements de cette étude.

Lam et coll. (2004) ont instillé des nanotubes de carbone par voie intratrachéale à des souris mâles B6C3F1 âgées de deux mois. Trois types de nanotubes ont été utilisés : les uns contenant du fer (27 %), les autres du nickel (26 %), et les derniers purifiés (2 % Fe). Les particules (granulométries non précisées) ont été mises en suspension dans du sérum par traitement aux ultrasons et injectées par voie intratrachéale aux doses de 0,1 ou 0,5 mg. Le noir de carbone et le sérum de souris utilisé pour la dispersion ont servi de témoins négatifs, le quartz de contrôle positif. Les souris ont été sacrifiées à 7 ou 90 jours, et des analyses histopathologiques des poumons effectuées.

Cinq des neuf souris traitées avec 0,5 mg de nanotubes contenant du nickel sont mortes entre le 4^e et 7^e jour après instillation, généralement après léthargie, inactivité et perte de poids. Ces symptômes ont également été observés chez les souris qui ont survécu, mais ils disparaissaient après une semaine. Aucun des animaux traités avec 0,1 mg n'a présenté d'effets cliniques.

Des signes modérés et transitoires d'inactivité, d'hypothermie, de piloréaction, et occasionnellement des frissons, ont été notés entre la 8^e et la 12^e heures après l'instillation à forte dose (0,5 mg) de nanotubes contenant du fer.

Les poumons des souris survivantes traitées à forte dose (0,5 mg) avec les nanotubes contenant du nickel présentaient de grands agrégats de particules dans les macrophages de l'espace alvéolaire. Certains de ces agrégats ont été retrouvés dans l'interstitium, formant des granulomes. Dans le groupe à faible dose (0,1 mg), aucun granulome n'a été détecté.

Les souris des groupes aux fortes doses (0,5 mg) de nanotubes avec du fer ou purifiés présentaient des granulomes proéminents dans la lumière des voies aériennes au 7^e jour. Ces nodules étaient localisés sous l'épithélium bronchique et présents dans tous les champs pulmonaires. Certains apparaissaient comme s'étendant dans les bronches,

comme des polypes. Ces granulomes étaient constitués de macrophages chargés de particules noires et comportaient très peu de lymphocytes, neutrophiles, éosinophiles ou autres cellules inflammatoires.

Les macrophages présentaient un cytoplasme granulaire abondant avec des bordures indistinctes. Les particules noires étaient presque entièrement contenues dans ces granulomes. Certains poumons apparaissaient anormalement gros à 90 jours. Leur examen microscopique montrait la persistance de granulomes contenant des macrophages chargés de particules et de nanotubes. Les lésions étaient généralement plus prononcées que celles observées au 7^e jour. Quelques-uns avaient des signes de nécrose et d'inflammation interstitielle étendue dans le septum alvéolaire, ainsi que de l'inflammation péri-bronchique.

Granulomes et autres lésions pulmonaires ont également été observés dans le groupe à faible dose (0,1 mg) de nanoparticules purifiées et de nanoparticules contenant du fer.

Aucun signe clinique n'a été observé chez les groupes témoins (sérum, noir de carbone et quartz). Les poumons des souris traitées avec le noir de carbone étaient normaux à l'examen microscopique, mise à part la présence de particules noires, principalement dans les alvéoles. Les poumons des animaux traités avec le quartz 0,1 mg apparaissaient également normaux. Le groupe quartz 5 mg présentait une augmentation du nombre des macrophages alvéolaires, certaines de ces cellules contenant des particules, et des signes d'inflammation faible à modérée au niveau des alvéoles et de l'interstitium. Les résultats aux 7^e et 90^e jours étaient généralement similaires. Une souris (groupe 0,5 mg) a présenté au 7^e jour une réaction granulomateuse de faible grade. Le groupe 0,1 mg a présenté à 90 jours une augmentation des clusters de lymphocytes péribronchiolaires.

Il apparaît donc que les trois sortes de nanoparticules induisent des granulomes interstitiels de manière dose-dépendante. Ces effets s'observent même dans le groupe de nanotubes purifiés.

Les causes des morts sont incertaines ; l'une des hypothèses, selon les auteurs, pourrait être la libération du nickel par les ultrasons, entraînant une intoxication à cet élément.

Les deux types de particules de carbone – noir de carbone et nanotubes – sont phagocytés par les macrophages, mais les réactions sont différentes. Les premières restent dans les alvéoles, les secondes pénètrent dans l'interstitium. Une contamination des échantillons par des poussières de graphite (qui donne des granulomes) a été évoquée par les auteurs, puis rejetée, les échantillons induisant le plus de granulomes étant les moins contaminés.

Warheit et coll. (2004) ont instillé par voie intratrachéale des nanotubes de carbone à des rats mâles (CrI : CD(SD)IGS BR, nombre non précisé), âgés de 8 semaines. Quatre types de particules ont été utilisés : du quartz, des particules de fer carbonyle, des suies produites (groupe nanoparticules) par ablation laser (30 à 40 % de carbone amorphe, 5 % de nickel et de cobalt et des nanotubes de carbone) et un mélange de

particules de graphite et de particules issues de catalyse. Pour chaque groupe, deux doses ont été utilisées : 1 et 5 mg/kg. Des lavages broncho-alvéolaires ont été effectués à 24 h, 1 semaine, 1 mois et 3 mois.

Le groupe 5 mg a accusé une mortalité de 15 % pour les 24 premières heures. Les auteurs ont évoqué la possibilité d'une obturation mécanique de voies aériennes supérieures ; les nanotubes n'étaient pas dispersés et formaient des agglomérats de 10 à 100 nanotubes. Aucun autre groupe n'a présenté de mortalité. Une augmentation temporaire du poids des poumons a été observée, dans le groupe 5 mg uniquement.

Seul le groupe exposé au quartz a montré une inflammation pulmonaire dose-dépendante, caractérisée par une accumulation de neutrophiles et de macrophages alvéolaires, ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur de l'épithélium.

Le groupe exposé aux nanotubes a présenté des granulomes multifocaux, non dose-dépendants. Les premières lésions ont été observées dès la première semaine. Les granulomes, formés de cellules mononucléaires, étaient centrés autour de nanotubes, principalement sous forme d'agglomérats. Il ne semble pas y avoir d'augmentation du nombre des lésions ni de leur taille après trois mois. Dans certains cas, les bolus de nanotubes entourés de cellules sont observés dans les bronchioles terminales. La prolifération cellulaire n'a pas été significativement augmentée (évaluée après injection intrapéritonéale de BrdU, 5-bromo-2'déoxyuridine).

Au total, les nanotubes ont produit une inflammation pulmonaire transitoire et des granulomes multifocaux, tandis que le quartz produisait une inflammation pulmonaire, une cytotoxicité et des signes précurseurs de fibrose.

Müller et coll. (2005) ont administré des nanotubes de carbone par voie intratrachéale (0,5, 2 ou 5 mg) à des rats Sprague-Dawley femelles. Des nanotubes multifeuillets ont été utilisés (15 couches en moyenne), dont certains échantillons ont été broyés. Des fibres de chrysotile et du noir de carbone ultra-fin ont servi de témoins positifs. En recourant à des nanotubes broyés, les auteurs ont voulu réduire le phénomène d'agglomération observé dans les études de Lam et Warheit. Ils ont évalué la biopersistance des nanotubes dans les poumons en dosant le cobalt, présent dans le catalyseur pour la synthèse et considéré comme fortement lié.

Deux mois après instillation, ces particules sont encore largement présentes dans les tissus pulmonaires, plus de 80 % pour les nanotubes classiques, 36 % pour celles qui sont broyées, ce qui semble indiquer que la longueur des nanotubes module leur clairance (la différence peut paraître importante, mais doit être nuancée en raison de l'étendue des intervalles de confiance). Une augmentation du niveau de la LDH, des protéines totales, ainsi que des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, 3 et 15 jours après l'instillation, traduisaient l'inflammation pulmonaire. Comme dans les deux précédents articles, les auteurs ont constaté la formation de granulomes développés autour d'agréats de nanotubes. Les

nanotubes broyés se sont dispersés de manière plus homogène, évitant la formation de ces agrégats dans les voies aériennes ; ils ont également entraîné la formation de granulomes parenchymateux. L'accumulation de collagène indique le possible caractère fibrosant de ces particules, de même que l'augmentation du TNF- α dans le liquide broncho-alvéolaire après deux mois.

Cette étude apporte des éléments sur la possibilité de biopersistance des nanotubes de carbone ainsi que sur leur capacité à engendrer une inflammation, voire une fibrose pulmonaire.

Shvedova et coll. (2005) ont instillé par voie pharyngée des nanotubes monofeuillet et observé des réactions d'inflammation pulmonaire (accumulation de PMN, jour 1, de lymphocytes, jour 3, de macrophages, jour 7 ; présence de cytokines inflammatoires et de facteurs fibrogènes). Une fibrose s'installait rapidement, sous deux aspects : a) des granulomes, le plus souvent associés à des cellules épithéliales hypertrophiées entourant des agrégats de nanotubes ; b) une fibrose interstitielle diffuse et un épaississement de la paroi alvéolaire.

Dans un résumé de quelques lignes, Kisin et coll. (2005) confirment la formation dose-dépendante de granulomes pulmonaires et de fibrose chez des souris C57BL/6 après aspiration par voie pharyngée de nanotubes de carbone. Le recrutement cellulaire, la teneur en protéines totales, l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la γ -glutamyltranspeptidase (GGT) étaient accrus dans le LLBA. La même équipe (Mercer et coll., 2005) a quantifié la réponse de type granulomateuse après aspiration unique de 10, 20, ou 40 μ g de nanotubes par souris, et après 1 jour, 7 jours, 1 mois ou 2 mois. Le dépôt se produisait généralement dans la 1^{re} ou 2^e bronchioles alvéolaires (diamètre moyen 15,2 μ m), et était infiltré de macrophages alvéolaires dès le jour 1. La formation de tissu conjonctif était significative au jour 7, et à 1 ou 2 mois, les masses granulomateuses étaient entourées d'un tissu de cellules épithéliales cuboïdales. À deux mois, les lésions granulomateuses occupaient respectivement 0,7 %, 2,4 % et 4,6 % du parenchyme alvéolaire pour les doses de 10, 20, ou 40 μ g de nanotubes. L'épaisseur des parois alvéolaires augmentait aussi en fonction de la dose (passant de 0,1 à 0,5 μ m).

Ces résultats ont encore été confirmés par une autre équipe (James et Lam, 2005) avec trois types de NTC (différant par la méthode de préparation et la teneur en métaux). L'un des échantillons ne provoquait de granulomes pulmonaires qu'à la dose la plus élevée (0,5 mg par souris), les deux autres dès 0,1 mg par souris.

La toxicité pulmonaire a été examinée du point de vue de son retentissement cardiovasculaire par une autre équipe du NIOSH (Li et coll., 2005). Cette dernière a instillé par voie intrapharyngée une dose unique de nanotubes de carbone (NTC ; 0,5, 1 ou 2 mg/kg) à des souris C57BL/6, et les ont examinées aux jours 1, 7, 28 et 60. Il a été constaté que les NTC induisaient une atteinte dose-dépendante de l'ADN mitochondrial aortique

(paramètre lié au stress oxydant) à partir du jour 7, et une modification de l'expression génique (dont les gènes MCP-1 et VCAM-1) au niveau du cœur. Ces effets ont pu aussi être observés *in vitro* sur des cellules endothéliales de l'aorte humaine ; ils pourraient favoriser l'athérogenèse.

Selon Tsuji et coll. (2006), une comparaison des effets pulmonaires des nanotubes et du quartz implique qu'une valeur limite provisoire pour les nanotubes devrait être inférieure à $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$, jusqu'à plus ample information et en attendant de savoir si une norme relative à la surface ne devrait pas être préférée. Dans leur revue critique des données toxicologiques, Lam et coll. (2006) évaluent cette valeur limite provisoire à $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Données humaines

Il n'a pas été trouvé de données toxicologiques chez l'homme exposé aux NTC. Une seule publication fait état d'une évaluation d'exposition à des NTU (Maynard et coll., 2004). Les concentrations atmosphériques massiques (évaluées indirectement *via* le dosage du catalyseur résiduel supposé attaché aux tubes) ne dépassaient pas $53 \mu\text{g}/\text{m}^3$; des dépôts de nanotubes ont été observés sur les gants des manipulateurs (0,2 mg et 6 mg).

Conclusion

L'EPA (2005) fait remarquer qu'un nanomatériau peut être produit par différents procédés : par exemple, des nanotubes de carbone peuvent être fabriqués de quatre manières différentes, ce qui peut impliquer différentes propriétés physicochimiques (taille, forme, composition...) et donc différentes propriétés toxicologiques. Elle ajoute qu'il n'est pas démontré que ces données sont parfaitement adaptées à l'évaluation des dangers de ces nanomatériaux.

Les nanotubes ont fait l'objet d'études toxicologiques de portée limitée (expositions uniques de courte durée pour la détection rapide d'effets éventuels). De plus, les caractéristiques des tubes étudiés sont rarement précisées (types de tubes, granulométrie, métaux résiduels [nature, concentration, biodisponibilité...], impuretés...).

La recherche d'effets pulmonaires chez l'animal a été menée uniquement par instillation. Il est possible que les effets observés résultent d'une surcharge des macrophages, dont la capacité d'épuration serait dépassée. Ce phénomène a été décrit chez le rat pour d'autres particules, mais ne semble pas l'avoir été chez la souris ; certains auteurs signalent que cette saturation survient à partir de 1 mg par gramme de poumon, dose plus forte que celle utilisée pour les nanotubes. Müller et coll. (2005) ont montré une biopersistence à deux mois de ces particules et une capacité à engendrer une inflammation

ainsi qu'une fibrose. Ces résultats demandent à être confirmés par des études par inhalation, avec des temps d'exposition et des durées d'observation plus longs.

En conclusion, comme les fullérènes, les nanotubes de carbone sont insuffisamment étudiés sur le plan toxicologique (voies de pénétration, cinétique, métabolisme, génotoxicité, toxicité chronique par inhalation...). Beaucoup de recherches restent à accomplir, que ce soit pour la caractérisation des échantillons, la prise en considération de niveaux d'exposition réalistes, l'expérimentation *in vivo*, le suivi dans l'organisme après pénétration, ou encore l'indicateur d'effet approprié selon l'organe-cible (Hurt et coll., 2006). Dans l'état actuel des connaissances, le caractère insoluble de ces particules, leur capacité à pénétrer à l'intérieur des cellules, à provoquer une cytotoxicité, et enfin leur forme de fibre, sont des éléments qui doivent inciter à la prudence (Müller et coll., 2006).

Bibliographie

- Birkett (2001). Fullerenes. *Annual Rep Prog Chem, Sect. A*, **97**, 417-442.
- Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, Bergamaschi A, Mustelin T (2005). Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett* **160**, 121-126.
- Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, Bergamaschi A, Mustelin T (2006). Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett.* **160(2)** 121-126.
- Cheng H, Cheng J (2005). The aggregation of single-walled carbon nanotubes in fresh water and sea water. *Toxicologist*, résumé n° 42 (page 9).
- Chopek J, B. Czajkowska, B. Szaraniec, E. Frackowiak, K. Szostak, F. Béguin (2006). *In vitro* studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon* **44(6)** 1106-1111.
- Cui D, Tian F, Ozkan CS, Wang M, Gao H (2005). Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett* **155(1)** 73-85.
- Donaldson K, Aitken R, Tran L, Stone V, Duffin R, Forrest G, Alexander A (2006). Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. *Toxicol Sci* **92(1)** 5-22 ; doi: 10.1093/toxsci/kfj130.
- EPA (2005). U.S. Environmental Protection Agency. Nanotechnology white paper. December 2, 123 pages. http://cohesion.rice.edu/CentersAndInst/ICON/emplibrary/EPA_Nanotechnology_White_Paper_EXTER_NAL_REVIEW_DRAFT_12-1-05.pdf
- Feigenbaum D, Nsamirizi A, Sinclair-Desgagne B (2004). Les nanotechnologies : leurs bénéfices et leurs risques potentiels. Centre inter-universitaire de recherche en analyse des organisations (CIRANO), Montréal, série scientifique, 43 pages.
- Fenoglio I, Tomatis M, Lison D, Muller J, Fonseca A, Nagy JB, Fubini B (2006). Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or scavenging activity? *Free Radic Biol Med.* **40(7)** 1227-1233.

- Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Bernier P (2006). Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon* **44**(6) 1100-1105.
- Garibaldi S, Brunelli C, Bavastrello V, Ghigliotti G, Nicolini C (2006). Carbon nanotube biocompatibility with cardiac muscle cells. *Nanotechnology* **17**, 391-397.
- Huczko A, Lange H (2001a). Carbon nanotubes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Full Sci Techn* **9**(2) 247-250.
- Huczko A, Lange H, Calko E, Grubeck-Jaworska H, Droszcz P (2001b). Physiological testing of carbon nanotubes: are they asbestos-like? *Full Sci Technol* **9**(2) 251-254.
- Hurt RH, Monthieux M, Kane A (2006). Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. *Carbon* **44**(6) 1028-1033.
- James JT, C. Lam C (2005). Pulmonary toxicity of carbon nanotubes in mice and implications for human risk assessment. *Toxicologist*, résumé n° 650 (page 133).
- Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, Pei R, Yan T, Zhao Y, Guo X (2005). Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol* **39**(5) 1378-1383.
- Keshava N, Murray AR, Gorelik O, Arepalli S, Gandelsman VZ, Castranova V, Shvedova AA (2004). Transcriptional regulation in response to carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells as detected by microarray analysis. *The Toxicologist* **78**(S-1), résumé n°703 (p. 145).
- Kisin E, Murray AR, Johnson V, Gorelik O, Arepalli S, Gandelsman VZ, Hubbs AF, Mercer RR, Baron P, Kagan VE, Castranova V, Shvedova AA (2005). Pulmonary toxicity of carbon nanotubes. *Toxicologist*, résumé n° 1041 (page 212).
- Kisin E, Murray AR, Schwegler-Berry D, Gandelsman VZ, Ganther MR, Castranova V, Shvedova AA (2004). Carbon nanotube exposure caused formation of free radicals, induction of oxidative stress and cytotoxicity in human keratinocytes and bronchial epithelial cells. *The Toxicologist* **78**(S-1) résumé n° 1483 (p. 435).
- Lam CW, James JT, Mccluskey R, Hunter RL (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci* **77**(1) 126-134.
- Lam CW, James JT, Mccluskey R, Arepalli S, Hunter RL (2006). A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit Rev Toxicol* **36**, 189-217.
- Li Z, Salmen R, Huldermen T, Kisin E, Shvedova A, Luster MI, Simeonova PP (2005). Pulmonary exposure to carbon nanotubes induces vascular toxicity. *The Toxicologist*, résumé n° 1045 (page 213).
- Manna SK, Sarkar S, Barr J, Wise K, Barrera EV, Jejelowo O, Rice-Ficht AC, Ramesh GT (2005). Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes. *Nano Lett* **5**(9) 1676-1684.
- Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V (2004). Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health A*. **67**(1) 87-107.
- Mercer RR, Scabilloni J, Kisin K, Gorelik O, Arepalli S, Murray AR, Castranova V, Shvedova AA (2005). Responses of lung parenchyma to carbon nanotubes. *The Toxicologist*, résumé n° 1042 (page 213).

- Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE (2005a). Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett* **155**(3) 377-384.
- Monteiro-Riviere NA, Wang YY, Hong SM, Inman AO, Nemanich RJ, Tan RJ, Witzmann FA, Riviere JE (2005b). Proteomic analysis of nanoparticle exposure in human keratinocyte cell culture. *The Toxicologist*, résumé n° 2183 (page 447).
- Müller J, Huaux F, Lison D (2006). Respiratory toxicity of carbon nanotubes: How worried should we be? *Carbon* **44**(6) 1048-1056.
- Müller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB, Lison D (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**(3) 221-231.
- Potapovich AI, Osipov AN, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Shvedova AA, Kagan VE (2005). Single walled carbon nanotubes activate RAW 264.7 macrophages: role in oxidative stress and inflammatory response. *The Toxicologist*, résumé n° 2282 (page 468).
- Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, Radomski MW (2005). Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol* 2005 Sep 12; [Epub ahead of print]
- Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, H Green ML, Sim RB (2006). Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol* **43**(3) 193-201.
- Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, Beach JM, Moore VC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausman KD, Colvin VL (2005). Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*. *Toxicol Lett* 2005 Oct 13; [Epub ahead of print]
- Shi Kam NW, Jessop TC, Wender PA, Dai H (2004). Nanotube molecular transporters: internalisation of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *J Am Chem Soc* **126**(22) 6850-6851.
- Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V, Baron P (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**(5) L698-708.
- Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P (2003). Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health, Part A* **66**(20) 1909-1926.
- Soto KF, Carrasco A, Powell TG, Garza KM, Murr LE (2005). Comparative *in vitro* cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission-electron microscopy. *J Nanopart Res* **7**(2-3) 145-169.
- Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, Santamaria AB (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci. J* **89**(1) 42-50.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR (2004). Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* **77**(1) 117-25.

Discussion (1).

Particules ultra-fines : propriétés physicochimiques et activité biologique

7

1. Propriétés de surface et réactivité des PUF

B. Fubini

1.1. Rôle de la surface dans la génération des radicaux libres

1.1.1. Radicaux libres et leur détection

Un radical libre est une espèce possédant un ou plusieurs électrons non appariés, qui lui confèrent généralement une importante réactivité. Sa présence peut être mise en évidence par différentes techniques de détection. Celles-ci peuvent être directes, comme la résonance paramagnétique électronique (RPE) associée, pour les radicaux à brève durée de vie, au « *spin trapping* », ou indirectes. Par exemple, pour suivre la production du radical hydroxyle $\text{HO}^\bullet$, on a souvent employé l'hydroxylation de différents substrats aromatiques (salicylate, benzoate, phénylalanine, guanine – Grootveld et Halliwell, 1986 ; Gutteridge, 1987). Pour la détection indirecte, on peut aussi faire appel, par exemple, à la rupture de la double hélice de l'ADN (Lund et Aust, 1992) ou à la spectroscopie de fluorescence (Wilson et coll., 2002), etc. Cependant, même l'altération de l'activité métabolique des cellules, ou l'apparition d'une inflammation, ou la

perturbation des défenses antioxydantes des cellules (par exemple avec une réduction de taux de glutathion), ou encore l'apparition de mutations au niveau cellulaire, peuvent être des indicateurs d'un stress oxydant (Rahman et coll., 2003).

1.1.2. Tests cellulaires sur radicaux libres et PUF

De nombreuses études de toxicité pulmonaire montrent que l'exposition aux particules ultra-fines (PUF) produit un stress oxydant beaucoup plus important que celui induit par des particules de plus grande taille de même composition chimique ; ceci se produit, il faut le souligner, à masses égales (Warheit 2004 ; Donaldson et coll., 1998). L'inhalation (Ferin et coll., 1992) ou l'instillation (Oberdörster et coll., 1992 ; Renwick et coll., 2001) de particules de TiO_2 de diamètre moyen 20 nm produit, chez les rats, une réponse inflammatoire bien plus grande que celle de particules de 250 nm ; on observe le même résultat après inhalation ou instillation de particules ultra-fines de noir de carbone (Li et coll., 1999). L'instillation de TiO_2 ultra-fin chez les rats provoque des phénomènes de cytotoxicité pour les macrophages alvéolaires, induit la formation de radicaux hydroxyle et augmente la peroxidation des lipides ; les particules fines ne montrent pas le même comportement (Afaq et coll., 1998). La production de radicaux hydroxyle par les PUF de noir de carbone est à l'origine de la diminution des niveaux intracellulaires du glutathion et de la réduction de l'activité métabolique de cellules épithéliales humaines (A549). Aucun de ces effets n'est provoqué par les particules fines (Stone et coll., 1998). Le stress oxydant enfin est à la base des effets génotoxiques (aberrations chromosomiques et apparition de micronoyaux) relevés par Rahman et coll. (2002) sur des cellules embryonnaires de hamster syrien (SHE) incubées avec des PUF de noir de carbone.

1.1.3. Tests acellulaires sur radicaux libres et PUF

À côté des études qui montrent les effets d'un stress oxydant sur des lignées cellulaires ou encore sur des animaux, d'autres, effectuées dans un milieu simplifié acellulaire, ont permis, en certains cas, d'isoler les radicaux formés et confirmé la plus grande capacité des PUF à produire des radicaux libres. Par exemple, Shi et coll. (2003) ont étudié par RPE la production de radicaux hydroxyle par différentes fractions particulières : la fraction ultra-fine s'est révélée la plus réactive. Wilson a confirmé, après incubation de particules de noir de carbone avec une molécule fluorescente sensible aux espèces actives de l'oxygène (EAO), l'activité supérieure des ultra-fines (Wilson et coll., 2002). Ainsi, Stone et coll. (1998) ont montré que des particules de noir de carbone, ultra-fines ou fines, provoquent la rupture de la double hélice de l'ADN, mais que les ultra-fines sont bien plus actives. Des observations de même nature ont été rapportées pour TiO_2 (Donaldson et coll., 1996).

1.1.4. Sites actifs à la surface donnant lieu à la formation de radicaux libres

Quels sont les sites réactifs présents à la surface des particules responsables de cette activité radicalaire ? En général, ils peuvent être classés dans l'une de ces trois catégories :

- ions de métaux de transition ;
- composés organiques ;
- radicaux de surface.

Ces facteurs n'ont pas tous la même importance dans la réactivité des PUF. Les tableaux 7.I et 7.II, ci-après, résument les principales informations actuellement disponibles sur la composition de quelques particules et les sites responsables de la formation d'espèces radicalaires.

| Ions de métaux de transition

Les ions des métaux de transition jouent un rôle primordial dans la production d'espèces radicalaires (figure 7.1 - Fubini et Otéro, 1999 ; Prahalad et coll., 2001 ; Donaldson et coll., 1998, 2003 ; Aust et coll., 2003) ; en raison de leur grande superficie, une quantité importante de métaux, provenant du processus de production ou bien du milieu, peuvent se trouver à la surface des PUF (Don Porto Carero et coll., 2001).

La réactivité de ces ions dépend de la typologie, de l'état d'oxydation et de l'état de coordination.

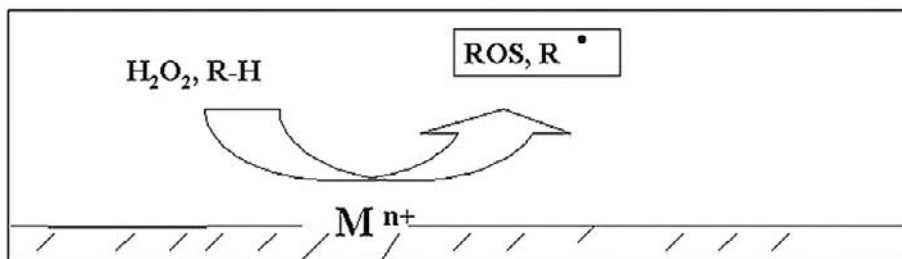


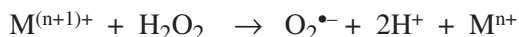
Figure 7.1. Des métaux de transition interagissant avec des molécules cibles à la surface des particules peuvent former des radicaux libres tels que des espèces activées de l'oxygène (comme le radical hydroxyle ou superoxyde), ou bien des radicaux du carbone comme ceux formés sur les chaînes latérales des acides gras polyinsaturés (R).

La typologie des ions présents à la surface dépend, à son tour, de la nature des particules. Bien que la composition soit variable selon l'emplacement et selon l'origine, les particules fines et ultra-fines sont souvent riches en plomb, cadmium, fer, nickel, chrome ou vanadium (Berubé et coll., 1999 ; Dye et coll., 1999 ; Muramoto et coll., 2001 ; Cass et coll., 2000 ; Shi et coll., 2003 ; Harrison et coll., 2000 ; Pritchard et coll., 1996 ; Spear et coll., 1998), qui sont tous des indicateurs de procédés de production anthropiques, tandis que les particules de plus grande taille, qui proviennent principalement de la croûte terrestre, sont riches en oxydes de fer, calcium, silicium ou aluminium (Glen et coll., 2000).

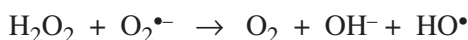
Parmi les métaux fréquemment présents sur les PUF, Cu, Fe, Ni, V, Ti et Co peuvent déclencher la production d'espèces activées de l'oxygène (Stohs et Bagchi, 1995 ; Halliwell et Gutteridge, 1986), au contraire du Zn (Chevion, 1988). En général, les métaux plus réactifs, *in vitro*, sont Fe et Cu (Halliwell et Gutteridge, 1986 ; Chevion, 1988). Dans une étude portant sur dix échantillons de différentes origines (naturelle ou anthropique), la concentration en fer s'est montrée en excellente corrélation avec l'aptitude des particules à induire la lipoperoxidation (Pritchard et coll., 1996). Le fer est déterminant, aussi, dans la production de radicaux libres pour beaucoup de matières particulières résultant de la combustion incomplète de combustibles fossiles (sidérurgie, cimenteries, incinération de déchets, trafic automobile, etc. - Donaldson et coll., 1997 ; Lloyd et coll., 1998 ; Van Maaneen, 1999 ; Pahala et coll. 2000). Des particules de noir de carbone recouvertes de Cu^{+2} (préparées en laboratoire pour mieux comprendre le rôle des contaminants inorganiques dans la génération d'espèces radicalaires) produisent quatre fois plus de radicaux hydroxyle que celles qui contiennent du vanadium, et huit fois plus que celles couvertes de fer. Les particules recouvertes de nickel sont moins réactives (Shi et coll., 2003). Le rôle du vanadium dans la génération d'un stress oxydant n'est cependant pas négligeable pour différentes cendres volantes (Dye, 1999). Le mécanisme le plus fréquent de la formation de $\text{HO}^\bullet$ en présence de H_2O_2 est la réaction de Fenton :



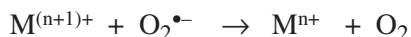
Une autre réaction possible est celle qui conduit à la production d'un radical anion super-oxyde par interaction de $\text{M}^{(n+1)+}$ avec l'eau oxygénée :



Une deuxième molécule d'eau oxygénée réagissant sur le radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ produit un radical $\text{HO}^\bullet$:



Le radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ est aussi capable de réagir avec $\text{M}^{(n+1)+}$ en le réduisant en M^{n+} :



lequel peut alors donner la réaction de Fenton (Halliwell et Gutteridge, 1986).

L'état d'oxydation des métaux dépend de différents facteurs. Pour la plupart des particules d'origine industrielle, il peut être rapporté aux procédés de production (Eagar et coll., 1997), ce qui pourrait expliquer, par exemple, la concordance des effets pulmonaires avec les différentes voies de production de fumées de soudage trouvée par Antonini et coll. (1996).

En étudiant le rôle des métaux dans la production de HO• sur le noir de carbone, Borm et coll. (2004) ont mis en évidence une réactivité différente des particules en fonction du degré d'oxydation. Par exemple, tandis que le V²⁺ et le V⁵⁺ ont une activité semblable, le Fe²⁺ est 3 fois plus actif que le Fe³⁺ (Shi et coll., 2003), en accord avec les données relatives aux particules grossières telles que des quartz (Fenoglio et coll., 2001) ou des amiantes (Tomatis et coll., 2002).

Enfin, des ions de faible degré de coordination, c'est-à-dire n'établissant pas des liens dans toutes les directions au contraire de ceux qui se trouvent à l'intérieur du solide, sont en général très réactifs (Pritchard et coll., 1996). Les métaux plus faiblement liés à la surface sont aussi ceux qui passent plus aisément en solution. En effet, plusieurs chercheurs ont mis en évidence qu'une grande partie des métaux peut être séparée des particules simplement en présence d'eau ou de solutions salines ; cette fraction est active dans la formation de radicaux libres (Gavett et coll., 1997 ; Knaapen et coll., 2002).

Les tableaux 7.I et 7.II suivants indiquent quelques caractéristiques générales de particules souvent trouvées en pollution atmosphérique.

Typologie de la particule*	Origine	Composition
Cendres volantes	Combustion du charbon	Oxydes de silicium, d'aluminium, de fer, alcalino-terreux
ROFA (<i>Residual Oil Fly Ash</i>)	Combustion d'huiles usées	Carbone, métaux de transition
Particules diesels	Combustion de moteurs diesels	Carbone élémentaire et composés aromatiques adsorbés
Noir de carbone	Production industrielle par décomposition thermique ou combustion incomplète de composés contenant carbone et hydrogène (hydrocarbures)	Carbone élémentaire et quantités variables de sous-produits adsorbés, en particulier composés aromatiques

Tableau 7.I. Origine et composition de quelques particule ultra-fines. * Toutes ces particules sont grossières, mais contiennent aussi une fraction ultra-fine, en quantité variable selon l'origine, avec une tendance à donner des agrégats.

Sources de radicaux	Cendres volantes	ROFA	Particules diesels	Noir de carbone	Silices cristallines
Métaux de transition	X (surtout fer)	X (surtout vanadium)			X (traces)
Composés organiques adsorbés			X	X	
Radicaux de surface					X (après broyage)

Tableau 7.II. Relations entre typologie de particules et sites responsables de l'activité radicalaire.

| Composés organiques

La présence de métaux à la surface ne suffit pas toujours à expliquer la capacité des PUF à produire des espèces radicalaires. En effet, le noir de carbone ne contient que de petites quantités de contaminants inorganiques, de l'ordre du ppm (Li et coll., 1999 ; Don Porto Carero, 2001), dont la quantité et la typologie dépendent du procédé de production (Roy et coll., 1995). En général, on trouve Ca, Na, Mg, souvent sous forme de carbonate ou de silicate, Zn sous forme d'oxyde – surtout à l'intérieur des particules – et sous forme de sulfure à la surface (Roy, 1995) et seulement dans certain cas (Li et coll., 1999 ; Brown et coll., 2000), Fe, Cu, Ni, Zn et Cr. Ni la séparation d'une partie de ces impuretés inorganiques suite au traitement des particules avec des solutions salines à différents pH, ni l'utilisation d'un agent chélatant (deferixamine) ne parviennent à réduire l'effet inflammatoire de ces PUF chez le rat (Brown et coll., 2000). De la même façon, la présence d'agents chélatants ne réduit pas la vitesse de déplétion *in vitro* du glutathion réduit et la formation résultante de glutathion oxydé (Zielinski et coll., 1999). Le fait que les métaux ne jouent pas un rôle dans la génération d'un stress oxydant par des PUF de noir de carbone n'exclut pas un possible effet synergique de ces PUF avec les sels des métaux de transition (surtout le fer) dans la production d'espèces radicalaires (Wilson et coll., 2002).

Quels sont alors les sites actifs à la surface des PUF de noir de carbone responsables de la production des radicaux libres ? Bien qu'on n'ait pas encore de réponse univoque à cette question, des indications sont fournies par l'analyse de la composition chimique et par des comparaisons avec des particules diesels (PED). Le noir de carbone contient du carbone amorphe (88-99 % de C), ainsi que de l'oxygène O (0,3-11 % en O) et de l'hydrogène (0,1-1 % en H), qui proviennent des procédés de production. L'oxygène est présent sous forme de groupements carboxylique, phénol, quinone ou encore lactone (Roy et coll., 1995). Les quinones peuvent former (figure 7.2) des radicaux superoxyde

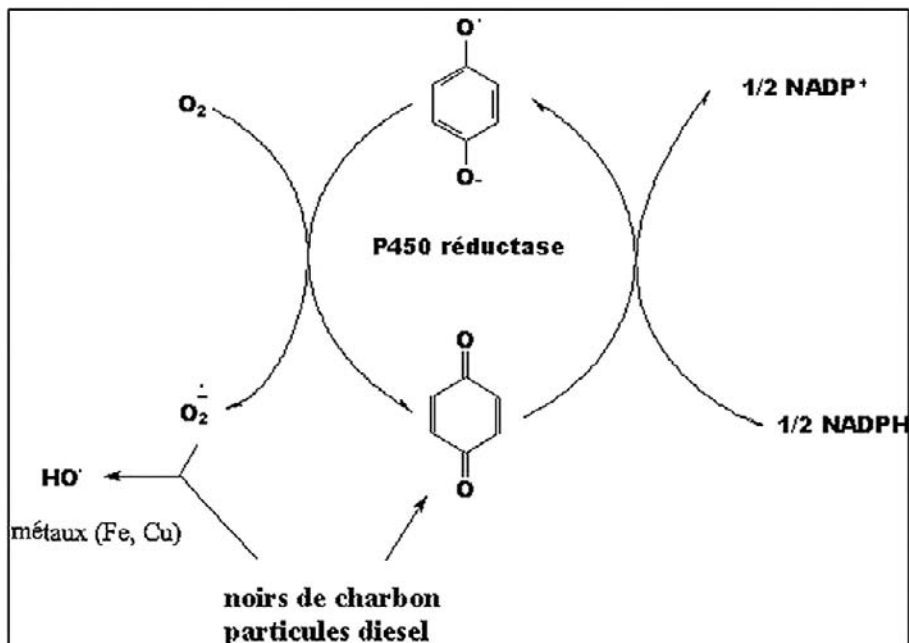


Figure 7.2. Génération d'espèces radicalaires par les quinones en présence de NADPH cytochrome P450 réductase.

en présence de NADPH cytochrome P450 réductase et NADPH (O'Brien, 1991 ; Monks et coll., 1992 ; Kumagai, et coll., 1997), comme pour les PED. En effet ces dernières, caractérisées par une surface riche en hydrocarbures aromatiques, provoquent l'inflammation des voies aériennes chez les souris, partiellement réversible suite à l'administration de superoxide dismutase (Sagai et coll., 1993 ; Lim et coll., 1998 ; Don Porto Carero et coll., 2001), vraisemblablement *via* la NADPH cytochrome P450 réductase, et stimulent la production d'espèces radicalaires même *in vitro* (radicaux mis en évidence par RPE) sans aucune activation biologique (Sagai et coll., 1993). Trois éléments confirment que cette activité est attribuable aux quinones adsorbées à la surface : a) si l'on traite les particules diesels avec du méthanol ou d'autres solvants organiques, la réactivité diminue sensiblement ; b) ces extraits stimulent eux-mêmes l'oxydation du NADPH et induisent une formation significative de $\text{O}_2^{\cdot -}$; c) le pré-traitement de PED avec du NaBH_4 , un agent capable de réduire les quinones en groupements hydroxyle, en inhibe la réactivité envers la NADPH (Kumagai et coll., 1997).

L'aptitude à former des espèces radicalaires dépend aussi de la structure cristallographique de la particule. Par exemple, les nanotubes de carbone ayant une structure cristalline semblable à celle du fullérène et formés de minuscules feuilles carbonées enroulées en cylindres concentriques (voir chapitre 6, point 4) ne donnent pas de radicaux détectables par les méthodes directes (spectroscopie RPE) ; au contraire, ils se comportent comme des pièges à radicaux (Fenoglio et coll., 2006).

| Radicaux de surface

Des espèces radicalaires peuvent également être produites en solution par l'action de radicaux de surface. Ce phénomène a été bien mis en évidence sur des surfaces siliciques où, par broyage, on peut arriver à la rupture homolytique de liaisons silicium-oxygène (figure 7.3), avec formation d'espèces telles que $\text{Si}^\bullet$, $\text{SiO}^\bullet$, qui peuvent à leur tour réagir avec des composants atmosphériques en donnant un radical silylperoxy et un anion superoxyde (Fubini, 1998).

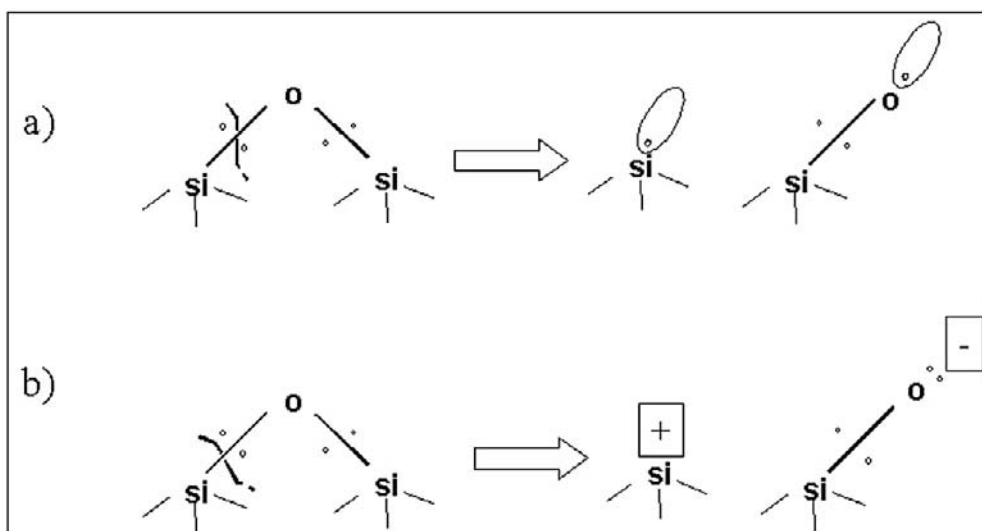


Figure 7.3. Formation de sites actifs à la surface d'une silice par broyage.

a) Rupture homolytique d'une liaison covalente: les deux électrons de la liaison covalente se partagent entre les deux atomes liés, donnant naissance à deux radicaux libres; b) Rupture hétérolytique: les deux électrons restent sur l'atome le plus électronégatif, donnant naissance à deux charges de surface, l'une positive et l'autre négative.

1.2. Rôle des propriétés de surface dans l'interaction avec des macromolécules biologiques

Le degré d'hydrophilie/hydrophobie et les groupements de surface capables de donner des liaisons hydrogène (typiquement OH ou NH) ou d'entraîner, après dissociation, des liaisons d'origine électrostatique, ont une influence sur l'interaction avec les membranes cellulaires et, en général, avec les macromolécules. L'interaction avec les membranes règle, à son tour, l'adhérence cellulaire et donc les processus d'internalisation. Elle peut d'ailleurs entraîner des changements dans la fluidité et la perméabilité des membranes (Cao et coll., 1988) et, à la limite, déclencher des phénomènes de membranolyse (Light,

1977 ; Nolan et coll., 1981), comme pour les silanols (SiOH) dans les silices et quelques silicates. Des modifications de la surface, notamment la création de sites hydrophobes par l'action de composés organiques, changent souvent d'une façon non négligeable la réactivité des particules. Le recouvrement du quartz avec du poly-(2-vinyl-pyridine *N*-oxide), par exemple, réduit les atteintes à l'ADN et, chez les rats, la réponse inflammatoire subséquente à l'instillation (Schins et coll., 2002 ; Knaapen et coll., 2004). Ainsi l'hydrophobisation des particules ultra-fines de TiO₂ diminue l'inflammation, toujours chez les rats, après instillation ou inhalation (Höhr et coll., 2002).

Comme exemple de complexité des surfaces, le tableau 7.III présente les principaux groupements fonctionnels des surfaces siliciques.

Typologie de surface	Groupements fonctionnels
Surfaces hydrophiles	silanols isolés -SiOH silanols vicinaux -Si(OH) ₂ silanols liés par liaisons hydrogène
Surfaces de particules en suspension aqueuse	silanols dissociés SiO ⁻
Surfaces chauffées	ponts siloxane symétriques Si-O-Si (non réactifs, hydrophobes) ponts siloxane asymétriques Si---O-Si (réactifs)
Surfaces formées par broyage	ponts peroxyde Si-O-O-Si radicaux Si• (« E' center ») radicaux SiO• radicaux peroxyde SiO₂• radicaux superoxyde Si + O₂•- charges superficielles Si⁺, SiO⁻ } réactifs

Tableau 7.III. Groupements fonctionnels présents à la surface des silices.

1.2.1. Liaison hydrogène

Une théorie proposée par Nash et coll. (1966) suggère que le potentiel des silanols superficiels des silices à donner des liaisons hydrogène, vraisemblablement avec l'oxygène des groupements carboxyliques des membranes cellulaires, est responsable de leur activité hémolytique (Hemenway et coll., 1993) et de leur cytotoxicité (Fubini et Wallace, 1999). De plus, la formation de liaisons hydrogène peut gouverner l'adsorption de macromolécules endogènes telles que des protéines. Si ces liaisons sont nombreuses, on peut parvenir à une adsorption irréversible qui peut, à son tour, entraîner le changement de la structure tertiaire de la protéine avec destruction partielle de l'hélice α (Andrade et coll., 1985 ; Brash et coll., 1987 ; Kurrat, et coll., 1994 ; 1997).

Enfin, la formation de ces liaisons peut favoriser l'agrégation des PUF. Par exemple, les PUF de silice de diamètre moyen compris entre 5 et 50 nm forment souvent des agrégats de 100-500 nm, lesquels peuvent former, à leur tour, des agglomérats de plus de 1 μm . L'hydrophobisation de ces particules par réaction avec des composés organiques (par exemple organosilanes) ou des traitements à haute température réduisent la quantité de silanols et donc les forces d'interaction entre les particules (Barthel, 1995, 1997 ; Legrand et coll., 1998).

1.2.2. Rôle des forces électrostatiques dans l'interaction avec les membranes cellulaires

Une théorie plus récente suggère que l'interaction avec les membranes et les macromolécules peut être expliquée plutôt par des forces électrostatiques, et dépend donc plus strictement de la charge superficielle (Langer et Nolan, 1985). Nolan et coll. (1981) ont constaté l'existence d'une corrélation entre la quantité des groupements de surface ionisables, tels que les silanols, et l'activité hémolytique d'un quartz (Minusil) ; les mêmes auteurs ont mis en évidence que l'adsorption des cations sur les groupements SiO^- conduit à une sensible diminution de cette activité.

L'activité hémolytique des PUF de silice, qui possèdent une charge superficielle négative, a été beaucoup étudiée. Gerashchenko (1994) a examiné l'activité hémolytique de différents échantillons préparés à partir d'une silice ultra-fine, l'Aérosil (Degussa, 1997), par traitement thermique à température variable, de 200 à 900 °C. Ce traitement ne change pas la structure amorphe, mais provoque une réduction progressive de la quantité de silanols superficiels (Iler, 1979 ; Legrand, 1998 ; Barthel, 1995), transformant les particules chauffées à 900 °C en particules hydrophobes, suite à la formation de ponts siloxanes entre silanols (voir figure 7.4). Ces particules montrent une activité hémolytique négligeable. Les PUF chauffées à température intermédiaire montrent, au contraire, une faible augmentation de la réactivité face aux globules rouges. Les auteurs expliquent ce comportement par la progressive diminution des groupements OH. Les équilibres d'interaction surface-cellules sont, en effet, complexes : les SiO^- interagissent vraisemblablement avec les groupements tétra-alkyl ammonium des phospholipides de membrane (Depasse, 1976). D'ailleurs, à la surface des globules rouges, il y a des groupements à charge négative, par exemple les groupements carboxyliques de l'acide N-acétylneuraminique, qui subissent avec les SiO^- des forces de répulsion. Sur les silices chauffées à haute température, il n'y a plus de silanols ionisables, tandis que sur les échantillons ayant des caractéristiques intermédiaires, les forces de répulsion sont diminuées et les forces d'attraction prennent l'avantage.

D'autres études ont montré que l'activité hémolytique diminue avec la taille des particules de silice (Harley et Margolis, 1961 ; Gerashchenko et coll., 1994, Mironvyuk et

coll., 2001). Les plus petites particules ont en effet une concentration surfacique inférieure de silanols, en raison des procédés de production employés (Gun'ko et coll., 2001 ; Mironvyuk et coll., 2001).

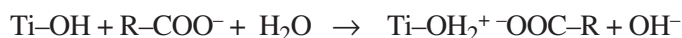
Les interactions électrostatiques jouent un rôle prédominant même pour l'adsorption des protéines (Kondo et Mihara 1996 ; Gun'ko, 2001 ; Larsericsdotter et coll., 2001).

Larsericsdotter et coll. (2001) ont étudié l'adsorption des lysozyme, ribonucléase et α -lactalbumine sur une silice amorphe ultra-fine en fonction du pH et de la force ionique. Les deux premières, chargées positivement à pH physiologique, ont une très grande affinité pour la surface du solide. Cette affinité augmente quand la force ionique de la solution diminue. L' α -lactalbumine, au contraire, ayant une charge nette négative, ne s'adsorbe pas. Kondo et Mihara (1996) ont étudié l'adsorption d'hémoglobine (HHb) et de myoglobine (HMb), dans un large éventail de pH, sur quatre particules ultrafines : TiO_2 , ZrO et deux types de silice amorphe différant par la présence d'ions aluminium. Ces particules ont toutes un diamètre moyen semblable (10-15 nm) et un potentiel ζ (dzêta) négatif à pH physiologique, ce qui implique une charge nette négative. Ces deux scientifiques sont parvenus aux mêmes résultats que Larsericsdotter : la quantité de HHb ou HMb adsorbée dépend fortement du pH. À pH élevé, cette quantité est réduite en raison des forces de répulsion entre les charges négatives de la surface et celles de la protéine (portées par les groupes $-\text{COO}^-$). Le maximum d'adsorption pour tous les solides se produit à pH 6-7, où dominent les forces d'attraction entre les charges négatives des solides et celles positives de la protéine (groupes $-\text{NH}_3^+$), dont le point isoélectrique est proche de 7. De plus, ces auteurs ont remarqué qu'à cette valeur de pH, la quantité adsorbée est environ deux fois plus élevée pour les oxydes de titane et de zirconium que pour les deux silices. Ce comportement peut être expliqué par la charge nette plus grande de ces dernières (Yongli et coll., 1999). Ils ont même examiné les changements de conformation de la protéine suite à l'adsorption. Les changements les plus importants, résultant de la plus grande affinité pour la surface du solide, sont liés à la diminution en pourcentage de l'hélice α et sont observés pour TiO_2 . Au contraire, on ne note pas de différences significatives à pH 7 entre les quantités de HHb et HMb adsorbées sur les deux types de silice, tandis qu'à pH 6, celle enrichie en aluminium est 2 fois plus active. L'adsorption de HMb est marquée par des changements de conformation importants à pH physiologique sur la silice enrichie en Al mais, après désorption, la protéine revient à une conformation semblable à celle de la protéine native, au contraire de celle adsorbée sur l'oxyde de zirconium. D'ailleurs, les PUF de silice adsorbent aussi l'albumine sérique de bovin (ASB) et provoquent une réduction du pourcentage en hélice α , changement lui-même réversible (Kondo et Fukuda, 1998).

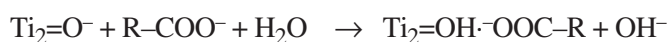
Enfin, Oliva et coll. (2003) ont étudié en détail les interactions de PUF de TiO_2 (essentiellement anatase) avec l'ASB à différents pH. Sur la surface de TiO_2 , on trouve deux types de groupements OH : ceux liés à un Ti, et ceux liés à deux Ti. Dans le premier groupe, on trouve trois fonctionnalités hydrophiles différentes, dont les

proportions varient avec le pH, Ti-OH_2^+ , Ti-OH , et Ti-O^- (Yates et coll., 1980), et deux dans le second groupe : $\text{Ti}_2=\text{OH}$ ($> \text{Ti-OH} > \text{Ti}_2=\text{O}^-$), et Ti-OH_2^+ (Hiemstra, 1989). À pH inférieur au point isoélectrique ($\text{pI} = 6$), les espèces prédominantes sont $\text{Ti}_2=\text{OH}$, suivie de $\text{Ti}_2=\text{O}^-$; pour des pH compris entre 6,0 et 7,0, les espèces prédominantes sont $\text{Ti}_2=\text{O}^- > \text{Ti-OH} > \text{Ti}_2=\text{OH}$. À $\text{pH} > 7,0$, les groupes prédominants sont $\text{Ti}_2=\text{O}^-$ et Ti-OH et, en petites quantités, Ti-O^- . En considérant le point isoélectrique de l'ASB, les forces dominantes sont dans l'ordre :

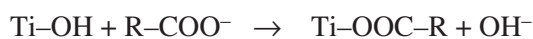
pH compris entre 3,5 et 6,0 :



interaction électrostatique ion-ion

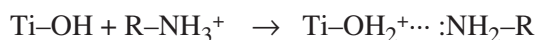


interaction avec liaison hydrogène

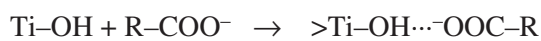


interaction par échange de ligand

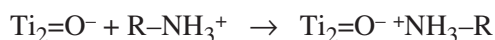
pH compris entre 6,0 et 7,0 :



interaction électrostatique ion-dipôle

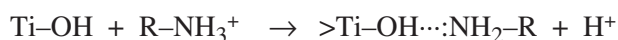


interaction avec liaison hydrogène



interaction électrostatique ion-ion

pH supérieur à 7,0 :



interaction avec liaison hydrogène

1.2.3. Rôle de l'hydrophilie

Le degré d'hydrophilie d'un solide reflète l'aptitude de sa surface à fixer l'eau ; il renseigne donc sur ses possibilités d'interactions avec le milieu biologique. Ces interactions étant multifactorielles, discerner le rôle propre de l'hydrophilie n'est pas toujours simple (Luck et coll., 1998) ; par exemple, on ne peut pas oublier que la plupart des groupes fonctionnels qui donnent un caractère hydrophile à une surface peuvent se dissocier (tableau 7.IV) en entraînant des interactions électrostatiques, ou peuvent former des liaisons hydrogène.

La plupart des publications se rapportent à des particules de grande taille ; bon nombre de chercheurs ont étudié, dans le cadre des biomatériaux, la relation entre l'hydrophilie et l'adsorption des plaquettes ou de protéines plasmatiques. Peu d'études ont été

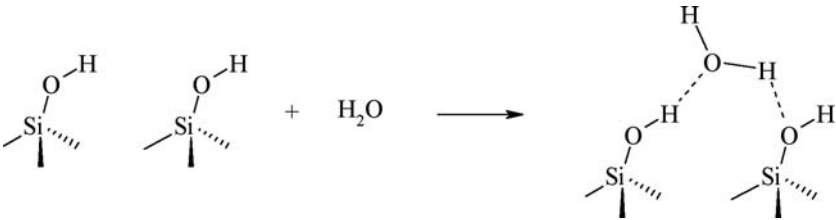
effectuées sur des PUF, à l'exception de nanoparticules conçues pour véhiculer des substances actives dans l'organisme.

Groupes fonctionnels	Typologie de la particule
-OH (hydroxyles et silanols)	Organique et inorganique
-COO ⁻ (carboxyles)	Organique
-NH ₂ (amine)	Organique
-SO ₃ H (acide sulfonique)	Organique et inorganique
Présence de métaux	Surtout particules inorganiques

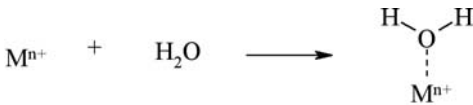
Tableau 7.IV. Groupes fonctionnels conférant un caractère hydrophile à la surface d'une particule.

Parmi les principales interactions des molécules d'eau avec la surface, on distingue :

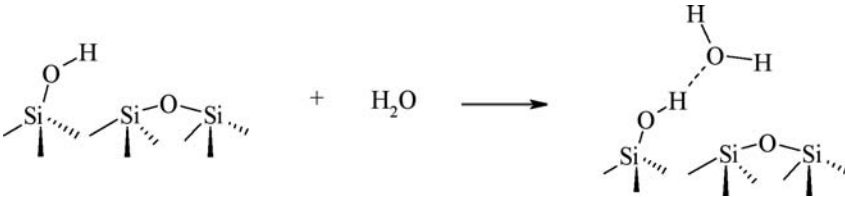
– la formation de liaisons hydrogène avec des OH voisins (par exemple silanols) :



– la coordination avec des cations :



– la formation d'une liaison hydrogène avec des OH isolés :



Les traitements thermiques à haute température, en favorisant la condensation des groupes silanols en ponts siloxane et en entraînant le passage des cations de surface à l'intérieur de la matrice, réduisent l'hydrophilie (figure 7.4).

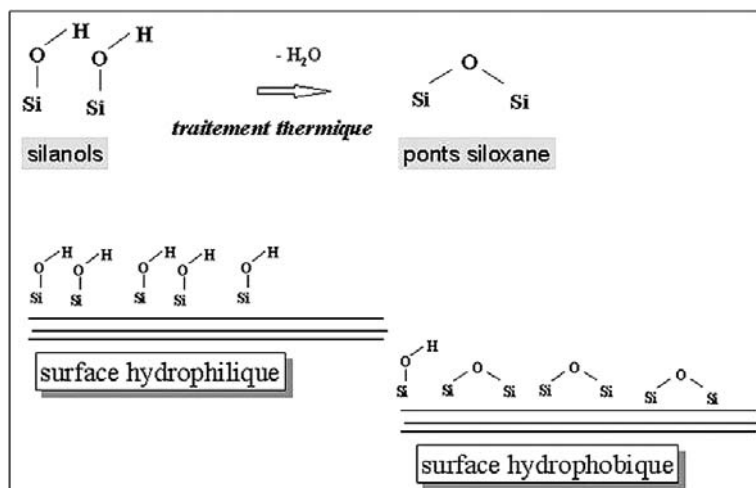


Figure 7.4. Transformation de la surface de silices par traitements thermiques.

L'hydrophilie d'un solide joue un rôle dans :

- l'interaction avec les cellules *in vitro* (Muller, 1991) ;
- la distribution des particules dans les différents organes et tissus (Muller, 1991) ;
- l'adsorption des protéines (Brynda et coll., 1984).

| Rôle de l'hydrophilie dans l'interaction avec les cellules *in vitro*

Une étude (Tomatis et coll., 2002) a mis en évidence une corrélation entre l'hydrophilie d'un groupe de fibres artificielles substitutives des amiantes, les fibres céramiques réfractaires (RCF), et leur capacité à induire des transformations morphologiques dans les cellules embryonnaires de cobaye. Les fibres les plus hydrophiles sont aussi les plus transformantes ; une relation similaire a été observée entre des particules de cristobalite et ces mêmes particules chauffées à 1 200 °C, donc moins hydrophiles (Fubini et coll., 1999). La diminution de l'hydrophilie entraîne vraisemblablement une réduction de l'adhérence aux membranes cellulaires et donc de l'internalisation de la fibre : la cytotoxicité d'un amiante, le chrysotile, pour des fibroblastes humains et des macrophages alvéolaires bovins, par exemple, diminue après un traitement thermique à 400 °C (Valentine et coll., 1983).

Sahoo et coll. (2002) ont remarqué que l'alcool polyvinylique (PVA), agent émulsifiant souvent utilisé dans la formulation de nanoparticules d'acide polylactique, modifie d'une façon non négligeable l'hydrophilie ainsi que l'internalisation cellulaire. Selon ces auteurs, ce comportement est attribuable à l'adsorption du PVA, qui augmenterait

l'hydrophilie des nanoparticules. Les particules les plus hydrophiles, en effet, sont moins phagocytées par les macrophages.

| Rôle de l'hydrophilie dans la distribution des particules dans les différents organes et tissus

La distribution des nanoparticules dans les différents organes et tissus dépend de plusieurs facteurs tels que la voie d'administration (inhalation, administration par voie intraveineuse, etc.), la phagocytose (par exemple par des macrophages ou des monocytes), l'opsonisation (adsorption en surface de certains composants du sang dénommés opsonines), etc. Dans le cadre de la mise au point d'agents capables de véhiculer des médicaments aux organes cibles, Tobio et coll. (1998) ont examiné l'adsorption et la distribution de deux nanoparticules d'acide polylactique (PLA), l'une telle quelle et l'autre recouverte de poly(éthylèneglycol) (PLA-PEG), après administration par voie nasale chez le rat. Les particules les plus hydrophiles (PLA-PEG) sont rapidement adsorbées par la muqueuse nasale, parviennent aux ganglions lymphatiques et dans le système circulatoire, et y demeurent longtemps par rapport aux particules plus hydrophobes. Ces dernières sont en effet capturées par les monocytes qui les transportent préférentiellement dans le foie, où elles s'accumulent. C'est dans ce même but de prolonger la présence dans le sang que Gref et coll (1998) ont utilisé la même technique.

| Rôle de l'hydrophilie dans l'adsorption des protéines

L'opsonisation joue un rôle important dans la phagocytose (une opsonine désigne en général toute substance renforçant la phagocytose, telle que anticorps, complément, protéine C réactive, fibronectine) ; elle dépend strictement du degré d'hydrophilie de la surface des particules, les plus hydrophobes étant les plus rapidement recouvertes de protéines. Ceci entraîne l'élimination rapide du système circulatoire.

Plusieurs protéines, notamment les IgG, la fibronectine, l'albumine sérique et le fibrinogène, s'adsorbent de préférence sur les surfaces hydrophobes, tandis que d'autres (comme le lysozyme) ont une plus grande affinité pour des surfaces hydrophiles. Luck et coll. (1998) et Gessner et coll. (2000) ont étudié l'adsorption de protéines sériques sur des nanoparticules de polystyrène synthétisées avec différents degrés d'hydrophilie : les moins hydrophiles adsorbaient une plus grande quantité de protéines. Parmi les plus adsorbées on trouve, en accord avec les données publiées concernant les particules grossières (Malmsten, 1994), l'ASB, le fibrinogène et les IgG, les IgM, les IgD. En

revanche, les apoprotéines sont peu adsorbées sur les surfaces hydrophobes et pas du tout sur les surfaces hydrophiles.

1.3. Effet des dimensions des particules dans l'interaction avec les cellules et dans l'adsorption des protéines

Si, pour les particules fines et grossières, les caractéristiques chimiques et physiques de surface ont bien plus de pertinence que leur dimension dans l'interaction avec les cellules ou pour l'adsorption des protéines, pour les PUF les dimensions jouent un rôle primordial. La plupart des cellules ont un diamètre moyen compris entre 2 (par exemple plaquettes) et 20 μm (par exemple ostéoblastes). Les interactions avec des particules de taille supérieure à celle des cellules comportent, le plus souvent, des phénomènes d'adhérence. Ces derniers ont été beaucoup étudiés, surtout dans le cadre des biomatériaux (Sun et coll., 1998). L'interaction avec des PUF peut conduire à l'internalisation des particules, avec des conséquences qui dépendent largement des caractéristiques du solide. Un cas particulièrement représentatif est celui de l'hydroxyapatite, un phosphate de calcium utilisé pour la fabrication de prothèses osseuses. L'hydroxyapatite est douée d'une excellente biocompatibilité : une fois implantée, elle est progressivement colonisée, puis remplacée par un os lamellaire par les ostéoblastes. Des études concernant l'adhérence et la croissance des ostéoblastes sur ce matériau ont montré que la réduction des dimensions du solide (ont été examinés quatre échantillons ayant un diamètre compris entre 800-400, 250-170, 60-39 et 3-0,5 μm) provoque une inhibition de la croissance des cellules et l'apparition de phénomènes de toxicité (Sun et coll., 1998). Ces phénomènes sont plus marqués pour des particules ayant un diamètre moyen inférieur à 3 μm , en accord avec l'hypothèse d'Evans (1994) selon laquelle la toxicité augmente pour les particules de moins de 5 μm .

L'interaction avec une cellule conduit parfois à la lyse de la membrane. À ce propos, Harley et Margolis (1961) ont cherché une corrélation entre les dimensions des particules de silice colloïdale et la lyse des globules rouges. Lors d'une étude avec des silices ayant un diamètre de 3, 4, 5, 7 ou 30 nm, ils ont mis en évidence que les particules de taille inférieure à 4 nm ne sont guère actives, mais qu'à partir de 5 nm l'activité augmente avec les dimensions. Ainsi Charache et coll. (1962) ont remarqué que l'acide monosilicique, *per se*, ne provoque pas la lyse des globules rouges, mais devient actif après polymérisation en particules grossières.

Enfin, il est bien connu que les dimensions jouent un rôle dans la pénétration des particules dans les voies aériennes et dans les processus d'épuration opérés par les macrophages (voir chapitre 3).

L'adsorption des protéines à la surface des solides a été, elle aussi, largement étudiée dans le cadre des biomatériaux. Il existe au contraire peu de publications sur la relation entre dimensions des particules et adsorption de protéines dans le domaine des particules ultra-fines. La plupart des PUF ont des dimensions comparables à celle des protéines (tableaux 7.V et 7.VI).

Protéine	Dimension (nm)	Masse molaire (Kda)
Albumine	14 × 4 × 4	69
Hémoglobine	6,4 × 5,5 × 5,0	65
Lysozyme	5,0 × 3,0 × 3,0	14
Ferritine	7,5 × 12,5	460
Fibrinogène	5 × 4,5	340

Tableau 7.V. Dimensions de certaines protéines notamment employées dans les études d'adsorption.

Échantillon	Dimensions (diamètre moyen, nm)	Surface spécifique (m ² /g)	Agrégats (nm)
Noir de carbone (Brown et coll., 2000; Wilson et coll., 2002; Zelinsky et coll., 1999; Don Porto Carero et coll., 2001)	14 -50	32-250	
Oxyde de fer (Zhou et coll., 2003)	10-50		200
Dioxyde de titane (Oberdörster, 2001)	20		
Silices colloïdales (Zielinsky et coll. 1999; Gun'ko et coll., 2001)	5-50	150-600	100-500

Tableau 7.VI. Dimensions moyennes de quelques particules ultra-fines.

Après adsorption, certaines protéines subissent des changements de conformation qui peuvent aller jusqu'à les dénaturer. Lundgren et Swensson (1953) ont montré que ces effets augmentent avec la dimension des particules. Glomme et coll. (1958) ont constaté que la toxicité de solutions d'acide monosilicique croît avec son degré de polymérisation : alors qu'au-dessous d'une certaine masse molaire, il n'y a pas dénaturation, elle devient marquée pour des particules grossières. Margolis a étudié ces phénomènes sur des protéines globulaires adsorbées à la surface de silices colloïdales de diamètre moyen compris entre 2 et 30 nm, et il est parvenu aux mêmes conclusions (Harley et Margolis,

1961 ; Margolis, 1960, 1963). Selon la théorie de Margolis, les protéines adsorbées interagissent avec la surface par des liaisons hydrogène ou des forces électrostatiques (voir paragraphes 1.2.1 et 1.2.2) et s'étendent plus ou moins sur cette surface. Plus grosse est la particule, plus la protéine est susceptible d'établir de liaisons avec la surface ; au contraire, si la particule est très petite (voire quelques nm), la protéine n'aura qu'un nombre limité de points de contact. La figure suivante (figure 7.5) illustre les différentes possibilités d'interactions solide-protéine. On observe le même phénomène lorsque l'adsorption se produit à partir d'une solution très riche en protéine : au fur et à mesure qu'augmente la quantité adsorbée, les changements de conformation diminuent.

Le processus d'adsorption est compliqué par la tendance de la plupart des particules à donner des agrégats et des agglomérats avec une structure poreuse, même pour des dimensions proches du micromètre. La formation de ces agrégats dépend des dimensions des particules primaires et de la quantité de liaisons établies. Quand une molécule protéique est adsorbée sur des agrégats compacts, la formation de liaisons entre la protéine et la surface peut induire un allongement de la structure avec perte partielle de l'hélice α (figure 7.6).

De plus, si les pores sont suffisamment larges, la protéine peut diffuser à l'intérieur : par exemple, l'albumine pénètre bien à l'intérieur de pores ayant un diamètre moyen supérieur à 25 nm (Tarasavich et Monakhova, 2001).

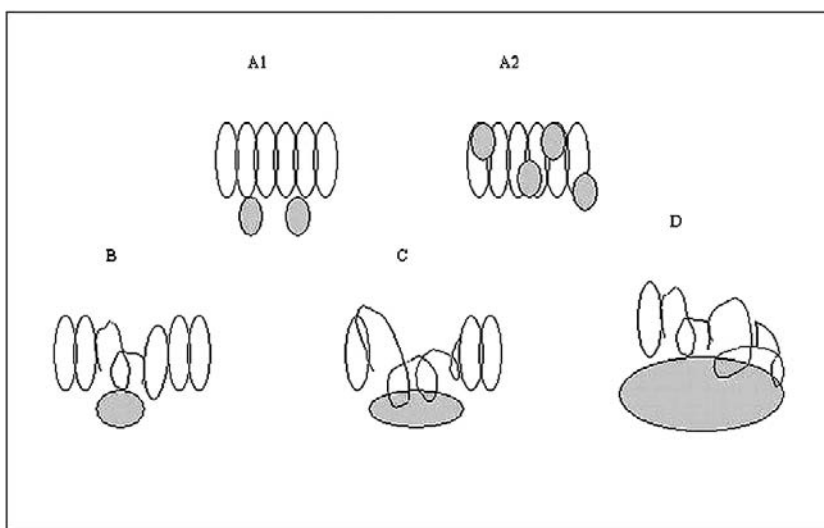


Figure 7.5. Mécanisme de dénaturation de protéines par des particules de silice colloïdale. (A1) Des particules de 2 ou 3 nm sont trop petites pour induire des altérations significatives de la protéine, ou bien les particules elles-mêmes peuvent s'adsorber sur la protéine (A2). B) et C) Des particules de 5-10 nm de diamètre causent en général une altération limitée de la conformation. D) Des particules de 20-30 nm peuvent induire la dénaturation de la molécule organique.

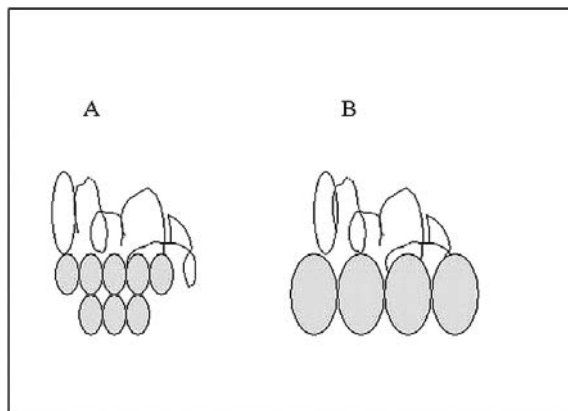


Figure 7.6. Adsorption de protéines sur des agrégats de particules ultra-fines.

1.4. Rôle de la surface spécifique des PUF sur l'intensité et la spécificité de la réponse biologique

La réponse biologique aux PUF dépend de plusieurs paramètres physicochimiques tels que les dimensions, la composition chimique, la structure de la surface, l'agrégation, etc. Tous ces facteurs peuvent modifier l'interaction avec le milieu biologique en modifiant par exemple l'internalisation cellulaire, l'adsorption des protéines, etc. (chapitre 1, point 4 ; chapitre 3).

Bon nombre de publications scientifiques ont présenté des éléments soulignant l'importance de la surface spécifique dans l'interprétation des résultats. En effet, l'expression de ces derniers en fonction de la surface permet, parfois, de rendre compte de certaines réponses cellulaires, par exemple la cytotoxicité (Lison et coll., 1997), la déplétion de GSH (Faux et coll., 2003), la réponse inflammatoire (Hetland et coll., 2001 ; Faux et coll., 2003), la capacité d'adhérence des cellules à un substrat externe (Murphy et coll., 1999) etc., ou de certains effets *in vivo* tels que la clairance pulmonaire (Kreyling et coll., 1993; Oberdörster et coll., 1994), l'incidence de tumeurs déclenchées par des particules (Driscoll, 1996 ; Oberdörster et Yu, 1990), ou encore la réponse inflammatoire (Oberdörster, 2000 ; Oberdörster et coll., 2000 ; Tran et coll., 2000 ; Brown et coll., 2000 ; Donaldson et coll., 2002).

Certaines propriétés des solides, comme la biopersistance ou la surface spécifique (m^2/g), n'influencent pas la typologie de la réponse biologique, mais son intensité. C'est-à-dire, une particule plus biopersistante qu'une autre ne détermine pas, par exemple, des effets inflammatoires plutôt que des effets génotoxiques mais, si elle demeure longtemps dans l'organisme, la réponse inflammatoire pourra être plus intense que celle d'une particule

rapidement épurée, ou bien, s'il y a des sites réactifs de surface capables de déclencher la production d'espèces radicalaires, la quantité de radicaux produite par une particule d'aire spécifique de $10 \text{ m}^2/\text{g}$ sera, évidemment, plus importante que celle dégagée par une particule d'aire dix fois moindre. Cependant, dans la littérature scientifique, il y a encore des confusions entre l'importance de l'aire (surface spécifique) et la réactivité de surface.

Ce qui suit résume les principales publications concernant le rôle de la surface, qui montrent bien la complexité du problème.

D'après les données comparant des particules de même composition chimique mais de dimensions très différentes, on peut partager, pour ce qui concerne le rôle de la surface spécifique, les PUF en quatre classes :

- PUF ayant les mêmes effets que des particules de plus grande taille lorsqu'on les compare par unité de surface, mais avec des effets plus marqués si elles sont comparées par doses massiques ;
- PUF ayant les mêmes effets que des particules de plus grande taille, ou des effets moins importants, quelle que soit l'unité de mesure (masse ou surface) employée pour les comparer ;
- PUF ayant toujours des effets plus marqués que celles de plus grande taille, même si elles sont comparées par unité de surface ;
- particules avec une dimension nanométrique n'existant qu'à ce niveau.

Pour les particules de classe a), l'extension de la surface rend compte d'une large partie des effets biologiques, tandis que pour celles des autres classes, c'est la réactivité variable de la surface, due par exemple à une origine différente entre particules fines et grossières, qui permet d'en mieux comprendre l'action biologique.

Classe a) : PUF ayant les mêmes effets que des particules de plus grande taille lorsqu'on les compare par unité de surface, mais avec des effets plus marqués si elles sont comparées par doses massiques.

Dans ce cas, les caractéristiques de surface des particules fines et ultra-fines sont comparables, et les effets sont principalement dus à l'interaction de sites actifs (par exemple ceux capables d'engager la production de radicaux libres) avec le milieu biologique. Brown et coll. (2001) et Donaldson et coll. (2002) ont remarqué que la capacité inflammatoire de masses variables de particules fines et ultra-fines instillées chez des rats, probablement associée à l'induction d'un stress oxydant, est liée linéairement à la surface des particules. D'autre part, Oberdörster (2000) a constaté que les proportions de PMN, dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de rats et souris après instillation, se placent sur une courbe unique pour TiO_2 fin et ultra-fin en fonction de la surface, mais non en fonction de la masse, montrant que, dans ce cas, la plus grande activité de l'ultra-fin (figure 7.7). De la même façon, Lison et coll. (1997) ont mis en évidence que la

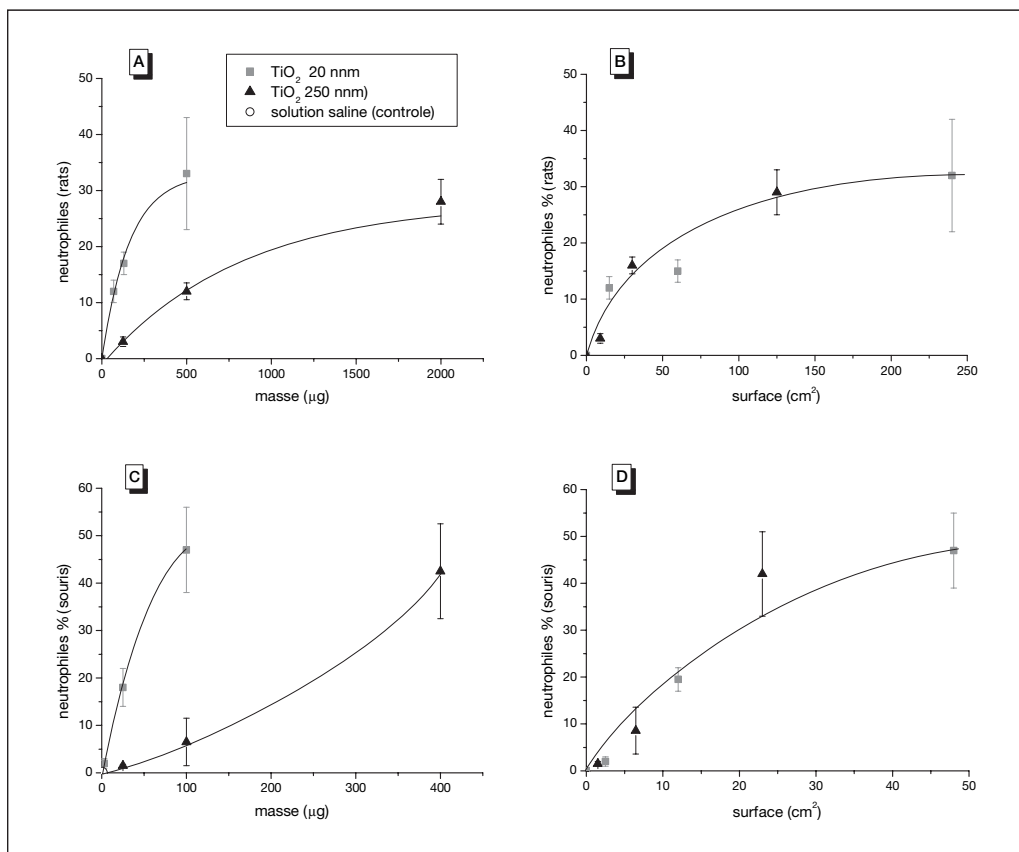


Figure 7.7. Réponse inflammatoire induite par des particules fines et ultra-fines de TiO_2 instillées dans les rats (A et B) et dans les souris (C et D): comparaison des effets par masse (A et C) et par surface totale (B et D). D'après Oberdörster et coll., 2005.

toxicité sur le macrophage péritonéal de rat (LDH, protéines totales, recrutement cellulaire du LLBA) d'échantillons de MnO_2 de différentes dimensions dépend de la surface totale des particules (figure 7.8).

La réduction de la taille entraîne, en tous ces cas, une augmentation de la surface spécifique, et par conséquent du nombre des groupes réactifs, avec un accroissement des effets pour les mêmes doses.

Classes b) et c) : particules de réactivité différente quelle que soit l'unité de mesure (masse ou surface) employée pour les comparer avec les particules de plus grande taille.

Pour les particules appartenant aux classes (b) et (c), on peut vraisemblablement supposer que d'autres paramètres jouent, au-delà de la surface spécifique, un rôle dans le déclenchement des effets toxiques, par exemple la forme, fibreuse ou non, ou la cristallinité. Warheit et coll. (2006), par exemple, ont remarqué que des « nanodots »

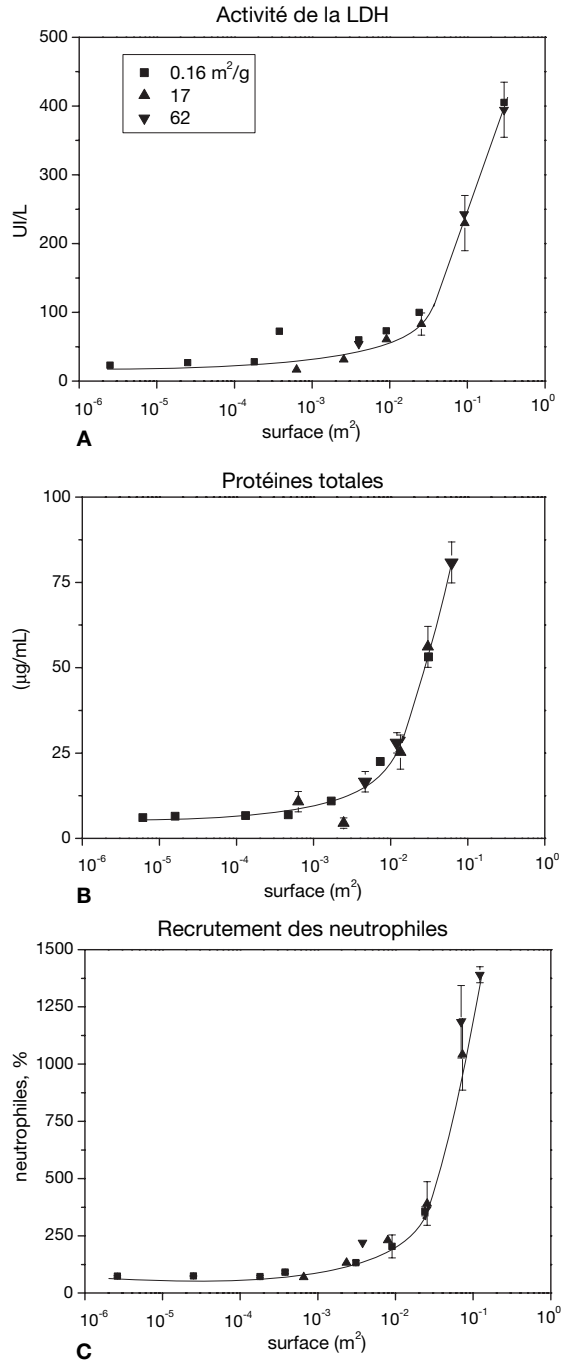


Figure 7.8. Cytotoxicité (A) et activité de marqueurs d'inflammation du LLBA - Recrutement de PMN (B) et protéines totales (C) - chez des souris après instillations intratrachéales de MnO_2 de surfaces spécifiques croissantes. D'après Lison et coll., 1997.

(nanoparticules sensiblement sphériques) et « nanorods » (nanobâtonnets) de TiO_2 (anatase) provoquent, après instillation chez des rats, la même réponse inflammatoire que des particules de TiO_2 (rutil) de plus grande taille. Il est également possible que certaines caractéristiques de surface changent lorsque les dimensions diminuent : c'est le cas de particules de même composition chimique mais d'origines différentes (naturelle ou artificielle). À ce propos, le même auteur a souligné (229th ACS National Meeting, San Diego, CA, March 13-17, 2005) que des nanoparticules de quartz, obtenues en conditions hydrothermales, provoquent une inflammation plus faible que des particules grossières d'origine naturelle. Ces deux cas peuvent être classés dans la classe b).

Un exemple de particules ayant une réactivité spécifique importante, même comparées par unité de surface, par rapport à celle de particules de plus grande taille est fourni par Lison et coll. (1997), qui remarquent que le bioxyde de manganèse fraîchement broyé présente *in vitro* une cytotoxicité accrue par rapport aux particules d'origine, vraisemblablement en raison de la formation de sites superficiels lors du broyage. La réduction de la taille peut donc accroître les défauts structuraux du cristal, avec par exemple une altération des propriétés électroniques.

Toutefois, le classement de particules en catégorie c) n'est pas si simple lorsque l'on considère que la plupart des études de toxicité *in vivo* ou *in vitro* ont été conduites en employant des masses variables d'échantillon et en ne tenant pas compte de l'extension de la surface.

Classe d) : particules avec une dimension nanométrique n'existant qu'à ce niveau.

Un exemple est fourni par les nanotubes de carbone, qui font partie des particules de nouvelle conception pour lesquelles aucune comparaison avec des particules micrométriques n'est possible.

Les considérations précédentes ouvrent un certain nombre de questions : la masse est-elle l'unité de mesure la plus convenable pour exprimer les résultats d'une expérimentation ? Ou bien serait-il mieux de tenir également compte d'autres paramètres, comme la surface totale et le nombre des particules ? Tous ces paramètres sont, d'ailleurs, interdépendants : des masses égales de poudres fines et ultra-fines contiennent, en effet, un nombre différent de particules et exposent une surface totale différente (tableau 7.VII).

Diamètre des particules (μm)	Nombre de particules par ml d'air	Surface totale ($\mu\text{m}^2/\text{ml d'air}$)
2	2	30
0,5	153	120
0,02	2 390 000	3 000

Tableau 7.VII. Exemple de relation entre dimensions, nombre et surface totale pour particules fines et ultra-fines. (D'après Nel et coll., 2006.)

Dans les études *in vivo* il faut donc prendre en considération de possibles phénomènes de surcharge au niveau des macrophages alvéolaires. Ces phénomènes ne semblent pas spécifiques, étant observés même avec des solides « inertes » (TiO_2 , noir de carbone), mais semblent dépendre du nombre des particules et de la surface totale : à masse égale, les particules les plus petites peuvent donc déclencher une surcharge importante (voir chapitre 3).

De plus, dans l'évaluation de certains phénomènes physicochimiques tels que l'adsorption de molécules endogènes, notamment des protéines, qui dépend de la présence de groupements fonctionnels spécifiques à la surface du solide ou de la génération d'espèces radicalaires liées à la présence de sites réactifs, la surface totale paraît souvent mieux rendre compte des résultats.

Bibliographie

- Afaq F, Abidi P, Matin R, Rahman Q (1998). Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J Appl Toxicol* **18**(5) 307-12.
- Andrade J.D (1985) Principles in Protein Adsorption. In: *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, Vol. 2, Plenum, New York.
- Antonini JM, Krishna Murthy GG, Rogers RA, Albert R, Ulrich GD, Brain JD (1996). Pneumotoxicity and pulmonary clearance of different welding fumes after intra-tracheal instillation in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **140**, 188–190.
- Aust AE, Ball JC, Hu AA, Lighty JS, Smith KR, Straccia AM, Veranth JM, Young WC (2003). Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. *Govt Reports Announcements & Index (GRA&I) Issue* 14.
- Barthel H (1995). Surface interactions of dimethylsiloxo group-modified. fumed silica. *Colloid. Surf. A* **101**, 217-226.
- Barthel H, Rosch L, Weis J (1996). Fumed silica: production, properties, applications. In: *Organosilicon Chemistry II. From Molecules to Materials* (N. Auner, J Weis, Eds.) pp. 761–778. VCH, Weinheim.
- Barthel H, Rösch L, Weis J (1997). Adsorption modelling of polydimethylsiloxane on silica using hexamethyldisiloxane as a model probe. *Surf Rev Lett* **4**(5) 873-878.
- Bérubé KA, Jones TP, Williamson BJ, Winters C, Morgan AJ, Richards RJ (1999). Physicochemical characterisation of diesel exhaust particles: Factors for assessing biological activity. *Atmosph Environ* **33**, 1599-1614.
- Borm P, Schins R, Albrecht C (2004). Inhaled particles and lung cancer, part B: Paradigms and risk assessment. *Internat J Cancer* **110**, 3-14.
- Brash JL, Horbett TA (1987). Protein at interfaces: physicochemical and biochemical studies, ASC Symposium Series, Vol. 342. American Chemical Society, Washington, DC.
- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* **175**(3) 191-199.

- Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K (2000). Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med* **57** 685-691.
- Brynda E, Cepalova NA, Stol M (1984). Equilibrium adsorption of human serum albumin and human fibrinogen on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *J Biomed Mater Res* **18**, 685-693.
- Cao CI, Lin, Lin KJ (1988). The injurious effect of quartz on cell membranes anti-injurious effects of alluminium citrate against the quartz. In: Abstract of VIIth International Penumocniosis Conference, Pittsburgh, PA, 1988, 109.
- Cass GR, Hughes LA, Bhavé P, Kleeman MJ, Allen JO, Salmon LG (2000). The chemical composition of atmospheric ultrafine particles. *Philos Trans Math Phys Engin Sci* **358**, 2581-2592.
- Charache P, MacLeod C, White P (1962). Effects of silicate polymers on erythrocytes in presence and absence of complement *J Gen Physiol* **45**, 1117-1143.
- Chevion MA (1988). Site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radic Biol Med* **5**, 27-37.
- Degussa (1997). Basic Characteristics of Aerosil. *Technical Bulletin Pigments*, No. 11. Degussa AG, Hanau.
- Depasse J, Warlus J (1976). Relation between the toxicity of silica and its affinity for tetraalkylammonium groups. *J Colloid Interface Sci* **56**, 618-621.
- Don Porto Carero A, Hoet PHM, Verschaeve L, Schoeters G, Nemery B (2001). Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol Mutagen* **37**, 155-163.
- Donaldson K, Beswick PH, Gilmour PS (1996). Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol Lett* **88**, 293-8.
- Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, MacNee W (1997). Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ Health Perspect* **105** (Suppl. 5), 1285-1289.
- Donaldson K, Li XY, MacNee W (1998). Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci* **29**(5-6) 553-560.
- Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V (2002). The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* **15**(2) 213-220.
- Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles PM10. *Free Radic Biol Med* **34**, 1369-82.
- Driscoll KE (1996). Role of Inflammation in the Development of Rat Lung Tumors in Response to Chronic Particle Exposure. *Inhal Toxicol* **8** (Suppl.) 139-153.
- Dye JA, Adler KB, Richards JH, Dreher KL (1999). Role of soluble metals in oil fly ash-induced airway epithelial injury and cytokine gene expression. *Am J Physiol* **277**, 498-510.
- Eagar TW, Sreekanthan P, Jenkins N, Brain JD, Krishna-Murphy GG, Antonini JM (1997). Study of Chromium in Gas Metal Arc Welding Fume. Trends in Welding Research Proceedings, Atlanta, GA.
- Evans EJ (1994) Damage *in vitro* following direct contact with fine particles of titanium, titanium alloy and cobalt-chrome-molybdenum alloy. *Biomaterials* **15**, 713-717.

- Faux SP, Tran CL, Miller BG, Jones AD, Monteiller C, Donaldson K (2003). *In vitro determinants of particulate toxicity: The dose-metric for poorly soluble dusts*, IOM Research Report **154**, ISBN 0-7176-2747-0.
- Fenoglio I, Prandi M, Tomatis M, Fubini B (2001). Free Radical Generation in the Toxicity of Inhaled Mineral Particles: the Role of Iron Speciation at the Surface of Asbestos and Silica. *Redox Rep* **6**, 235-241.
- Fenoglio I, Tomatis M, Lison D, Muller J, Fonseca A, Nagy JB, Fubini B (2006). Reactivity of carbon nanotubes: free radicals generation or scavenging activity? *Free Rad Biol Med* **40**, 1227-1233.
- Ferin J, Oberdorster G and Penney D P (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Resp Cell Mol Biol* **6**, 535-542.
- Freisleben HJ, Packer L (1993). Free-radical scavenging activities, interactions and recycling of antioxidants. *Biochem Soc Transact* **21**, 325-330.
- Fubini B (1998). Health effect of silicas. In: *The surface properties of silicas* (Legrand J.P. ed) chap 5, pp 415-464. J Wiley and Sons, Chichester.
- Fubini B, Wallace WE (1999). Modulation of silica pathogenicity by surface processes. In: *Adsorption on Silica Surfaces*. Papirer E, Dekker M eds, pp 645-664, Mulhouse, France.
- Fubini B, Otero-Aréan C (1999). Chemical aspects of the toxicity of inhaled mineral dusts. *Chem Soc Rev* **28**, 373-381.
- Fubini B, Zanetti G, Altilia S, Tiozzo R, Lison D, Saffiotti U (1999). Relationship between surface properties and cellular responses to crystalline silica: studies on heat-treated cristobalite. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 737-745.
- Gavett S, Sha. Madison SL, Dreher KL, Winsett DW, McGee JK, Costa DL (1997). Metal and Sulfate Composition of Residual Oil Fly Ash Determines Airway Hyperreactivity and Lung Injury in Rats. *Environ Res* **72**, 162-172.
- Gerashchenko B, Gun'ko VM, Gerashchenko II, Mironyuk IF, Leboda R, Hosoya H (2002). Probing the Silica Surfaces by Red Blood Cells. *Cytometry* **49**, 56-61.
- Gerashchenko BI, Gerashchenko II, Bogomaz VI, Pantazis CG (1994). Adsorption of Aerosil on erythrocyte surface by flow cytometry measurements. *Cytometry* **15**, 80-83.
- Gessner A, Waicz R, Lieske A, Paulke BR, Mader K, Muller RH (2000) Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Internat J Pharm* **196**, 245-249.
- Ghio AJ, Stonehuerner J, Dailey LA, Carter JD (1999). Metals associated with both the water-soluble and insoluble fractions of an ambient air pollution particle catalyze an oxidative stress. *Inhal Toxicol* **11**, 37-49.
- Glomme J, Holmquist CE, Swensson A (1958) Studies on the toxicity of silicic acid. *AMA Arch Ind Health* **17**, 204-209.
- Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Langer R (1996). PEG-coated biodegradable nanospheres for intravenous drug administration. In: Cohen S, Bernstein H, editors. *Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines*. New York, Marcel Dekker, pp 279-306.
- Grootveld M, Halliwell B (1986). Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl-radical formation *in vivo*. Identification of hydroxylated derivatives of salicylate in human body fluids. *Biochem J* **237**, 499-504.

- Gun'ko VM, Mikhailova VI, Zarko VI, Gerashchenko II, Guzenko NV, Janusz W, Leboda R, Chibowski S (2003). Study of interaction of proteins with fumed silica in aqueous suspensions by adsorption and photon correlation spectroscopy methods. *J Colloid Interface Sci* **260**, 56–69.
- Gun'ko VM, Mironyuk IF, Zarko VI, Turov VV, Voronin EF, Pakhlov EM, Goncharuk EV, Leboda R, Skubiszewska-Zieba J, Janusz W, Chibowski S, Levchuk YN, Klyueva AV (2001). Fumed Silicas Possessing Different Morphology and Hydrophilicity. *J Colloid Interface Sci* **242**, 90–103.
- Gutteridge JMC (1987). Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. *Biochem J* **243**, 709–714.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. **246**(2) 501–514.
- Harley JD, Margolis J (1961). Hemolytic activity of colloidal silica. *Nature* **189**, 1010–1011.
- Harrison RM, Yin J (2000). Particulate matter in the atmosphere: Which particle properties are important for its effects on health? *Sci Total Environ* **249**, 85, 101.
- Hemenway DR, Absher MP, Fubini B, Bolis V (1993). What is the relationship between hemolytic potential and fibrogenicity of mineral dusts? *Arch Environ Health* **48**, 343–7.
- Hetland RB, Schwarze PE, Johansen BV, Myran T, Uthus N, Refsnes M (2001). Silica-induced cytokine release from A549 cells: importance of surface area versus size. *Hum Exp Toxicol* **20**(1) 46–55.
- Hiemstra T, De Wit JCM, Van Riemsdijk WH (1989). Multisite proton adsorption modeling at the solid/solution interface of (hydr)oxides: II. Application to various important (hydr)oxides. *J Colloid Interface Sci* **133**, 105–117.
- Höhr D, Steinfartz Y, Schins RP, Knaapen AM, Martra G, Fubini B, Borm PJ (2002). The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *Int J Hyg Environ Health* **205**, 239–244.
- Iler RK (1979). The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, biochemistry. New York, John Wiley & Sons, 866 p.
- Kadiiska MB, Mason RP, Dreher KL, Costa DL, Ghio AJ (1997). In vivo evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. *Chem Res Toxicol* **10**, 1104–1108.
- Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: mechanisms. *Internat J Cancer* **109**, 799–809.
- Knaapen AM, Shi T, Borm PJ, Schins RP (2002). Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem* **234/235**, 317–326.
- Kondo A, Mihara J (1996). Comparison of Adsorption and Conformation of Hemoglobin and Myoglobin on Various Inorganic Ultrafine Particles. *J Colloid Interface Sci* **177**, 214–221.
- Kondo A, Fukuda H (1998). Effects of Adsorption Conditions on Kinetics of Protein Adsorption and Conformational Changes at Ultrafine Silica Particles. *J Colloid Interface Sci* **198**, 34–41.
- Kreyling WG, Cox C, Ferron GA, Oberdörster G (1993). Lung clearance in Long-Evans rats after inhalation of porous, monodisperse cobalt oxide particles. *Exp Lung Res* **19**(4) 445–467.
- Kumagai Y, Arimoto T, Shinyashiki M, Shimojo N, Nakai Y, Yoshikawa T, Sagai M (1997). Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust particle components

- with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage. *Free Radical Biol. Med* **22**, 479-487.
- Kurrat R, Prenosil JE, Ramsden JJ (1997). Kinetics of human and bovine serum albumin adsorption at silica- titania surfaces. *J Colloid Interface Sci* **185**, 1-8.
- Kurrat R, Ramsden JJ, Prenosil JE (1994). Kinetic model for serum albumin verification. *J Chem Soc Faraday Trans* **90**, 587-590.
- Langer AM, Nolan RP (1985). Physicochemical properties of minerals relevant to biological activities: state of the art. In: *In Vitro Effects of Mineral Dusts*. North Atlantic Treaty Organization Advanced Study Institute Ser G, Vol 3, pp 9-24 (Beck DC, Bignon J, eds) Berlin, Springer-Verlag.
- Larsericsdotter H, Oscarsson S, Buijs J (2001). Thermodynamic Analysis of Proteins Adsorbed on Silica Particles: Electrostatic Effects. *J Colloid Interface Sci* **237**, 98-103.
- Legrand AP (1998). The Surface Properties of Silicas. Wiley Ed, New York.
- Li XY, Brown D, Smith S, MacNee W, Donaldson K (1999). Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* **11**, 709-731.
- Light WG, Wei ET (1977). Surface charge and asbestos toxicity. *Nature* **26**, 537-539.
- Lim HB, Ichinose T, Miyabara Y, Takano H, Kumagai Y, Shimojyo N, Devalia JL, Sagai M (1998). Involvement of superoxide and nitric oxide on airway inflammation and hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles in mice. *Free Radical Biol Med* **25**, 635-644.
- Lison D, Lardot C, Huaux F, Zanetti G, Fubini B (1997). Influence of particle surface area on the toxicity of insoluble manganese dioxide dusts. *Arch Toxicol* **71(12)** 725-729.
- Lloyd DR, Carmichael PL, Phillips DH (1998). Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem Res Toxicol* **11**, 420-427.
- Luck M, Paulke BR, Schro W, Blunk T, Muller RH (1998) Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *J. Biomed. Mater Res* **39**, 478-485.
- Lund LG and Aust AE (1992). Iron Mobilization from Crocidolite Asbestos Greatly Enhances Crocidolite-Dependent Formation of DNA Single-Strand-Breaks in phi X174 RFI DNA. *Carcinogenesis* **13**, 637-642.
- Lundgren KD, Swensson A (1953). Experimental investigations on the significance of the size of the particles in the reaction of the peritoneum to amorphous silica. *Acta Med Scand* **145**, 84-90.
- Malmsten M (1994). Ellipsometry studies of protein layers adsorbed at hydrophobic surfaces. *J Coll Int Sci* **166**, pp 333-342.
- Margolis J (1960) Proceedings of the 8th International Congress of Hematology, Tokyo. PAN. Pac: Press. Tokyo, pp. 4-10.
- Margolis J (1963). The interrelationship of coagulation of plasma and release of peptides. *Ann NE Acad. Sci* **11**, 133-139.
- Mironyuk IF, Gun'ko VM, Turov VV, Zarko VI, Leboda R, Skubiszewska-Zie J (2001). Characterization of fumed silicas and their interaction with water and dissolved proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **180**, 87-101.

- Monks TJ, Hanzlik RP, Cohen GM, Ross D, Graham DG (1992). Contemporary issues in toxicology. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **112**, 2-16.
- Muller RH (1991). Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (WVG), Stuttgart. CRC Press, Boca Raton.
- Muramoto S, Maitani T, Aoyama I (2001). Distribution characteristics of acid-dissolved trace metals of suspended particulate matter (SPM) in Kurashiki, Japan. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* **36** 677-688.
- Murphy SAM, Bérubé KA, Richards RJ (1999). Bioreactivity of carbon black and diesel exhaust particles to primary Clara and type II epithelial cell cultures. *Occup Environ Med* **56**, 813-819.
- Nash T, Allison A.C, Harington J.S. (1966) Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity. *Nature*, **210**, 259-61.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* **311**, 622-627.
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PHM, Dinsdale D, Smith T, Haiyan X, Vermeylen J, Nemery B (2002) Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an *in vivo* hamster model. *Am J Respir Crit Care Med* **166**, 998–1004.
- Nolan RP, Langer AM, Harington JS, Oster G, Selikoff IJ (1981). Quartz haemolysis as related to its surface functionalities. *Environ Res* **26**, 503-520.
- O'Brien PJ (1991). Molecular mechanism of quinone cytotoxicity. *Chem Biol Interact* **80**,1-41.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193-199.
- Oberdörster G (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* **74**(1) 1-8.
- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE (1994). Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* **102** (Suppl. 5), 173-179.
- Oberdörster G, Yu CP (1990). The Carcinogenic Potential of Inhaled Diesel Exhaust: A Particle Effect? *J Aerosol Sci* **21**(Suppl. 1) 397-401.
- Oberdörster G (2000). Toxicology of ultrafine particles: *in vivo* studies. *Philos Trans: Math Phys Engin Sci* **358**(1775) 2719–2740.
- Oberdörster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, Elder AC (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* **96**, 5-74; disc. 75-86.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **113**(7) 823-839.
- Oliva FY, Avalle LB, Cámara OR, De Pauli CP (2003) Adsorption of human serum albumin (HSA) onto colloidal TiO₂ particles. Part I. *J Colloid Interface Sci* **261**, 299–311.
- Parfitt GD, Rochester CH (1983) Adsorption from Solution at the Solid/Liquid Interface. Academic Press, London, pp 9-13.
- Piskorz J, Majerski P, Radlein D, Wik T, Scott DS (1999) Recovery of Carbon Black from Scrap Rubber. *Energy & Fuels*, **13**, 544-551.

- Prahalad AK, Inmon J, Ghio AJ, Gallagher JE (2000). Enhancement of 2 deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage by coal and oil fly ash in relation to particulate metal content and availability. *Chem Res Toxicol* **13**, 1011–1019.
- Prahalad AK, Inmon J, Dailey LA, Madden MC, Ghio AJ, Gallagher JE (2001). Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity. *Chem Res Toxicol* **14**(7) 879-87.
- Prahalad AK, Soukup JM, Inmon J, Willis R, Ghio AJ, Becker S, Gallagher JE (1999). Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry. *Toxicol Appl Pharmacol* **158**, 81 - 91.
- Pritchard RJ, Ghio AJ, Lehmann JR, Winsett DW, Tepper JS, Park P, Gilmour MI, Dreher KL, Costa DL (1996) Oxidant Generation and Lung Injury after Particulate Air Pollutant Exposure Increase with the Concentrations of Associated Metals. *Inhal Toxicol* **8**, 457-477.
- Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss DG, Schiffmann D (2002). Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect* **110**, 797-800.
- Rahman I (2003). Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol* **36**, 95-109.
- Renwick LC, Donaldson K, Clouter A (2001). Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **172**, 119-27.
- Roy C, Rastegar A, Kaliaguine S, Darmstadt H, Tochev V (1995). Physicochemical properties of carbon blacks from vacuum pyrolysis of used tires. *Plastics, Rubber and Composites Processing and Applications* **23**, 21-30.
- Sagai M, Saito H, Ichinose T, Kodama M, Morri J (1993). Biological effects of diesel exhaust particles. I. *In vitro* production of superoxide and *in vivo* toxicity in mouse. *Free Radical Biol Med* **1**, 37-47.
- Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V (2002). Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Contr Release* **82**, 105-114.
- Sato T, Ruch R (1980). Stabilization of Colloidal Dispersions by Polymer Adsorption. Dekker, New York.
- Schins RPF, Duffin R, Höhr D, Knaapen AM, Shi T, Weishaupt C, Stone V, Donaldson K, Borm PJ (2002) Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol* **15**, 1166-1173.
- Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Goren D (1995). Particulate air pollution: an acute health effects. *The Lancet* **345**, 176–17.
- Shi T, Schins RPF, Knaapen AM, Kuhlbusch T, Pitz M, Heinrich J, Borm PJA (2003) Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. *J Environ Monit* **5**, 550-556.
- Spear TM, Svec W, Vincent JH, Stanisich N (1998). Chemical speciation of lead dust associated with primary lead smelting. *Environ Health Perspect* **106**, 565-571.
- Stohs SJ, Bagchi D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **8**, 321-336.

- Stone V, Shaw J, Brown DM, MacNee W, Faux SP, Donaldson K (1998). The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicol in Vitro* **12**, 649-659.
- Sun JS, Liu HC, Chang WH, Li J, Lin FH, Tai HC (1998). Influence of hydroxyapatite particle size on bone cell activities: an *in vitro* study. *J Biomed Mater Res* **39**, 390-397.
- Tarasavich YI, Monakhova LI, (2001). Interaction between globular protein and silica surfaces. *Colloid J* **64**, 482-487.
- Tobio M, Gref R, Sanchez A, Langer R, Alonso MJ (1998). Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharm Res.* **15**, 270-275.
- Tomatis M, Fenoglio I, Elias Z, Poirot O, Fubini B (2002). Effect of thermal treatments of refractory ceramic fibres on the induction of cytotoxicity and cell transformation. *Ann Occup Hyg* **46**, 176-180.
- Tomatis M, Prandi L, Bodoardo S, Fubini B (2002). Loss of surface reactivity upon heating amphibole asbestos. *Langmuir* **18**, 4345-4350.
- Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD, Donaldson K (2000). Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal Toxicol* **12(12)** 1113-1126.
- Valentine R, Chang MJ, Hart RW, Finch GL, Fisher GL (1983). Thermal modification of chrysotile asbestos: evidence for decreased cytotoxicity. *Environ Health Perspect* **51**, 357-68.
- Van Maanen JMS, Borm PA, Willemse B, Schliderman PAEL, Smith KR, Aust AE, Tomatis M, Fubini B (1999). In vitro effects of coal fly ashes: hydroxyl radical generation, iron release, DNA damage and toxicity in rat lung epithelial cells. *Inhal Toxicol* **11**, 1123-1141.
- Warheit D (2004). Nanoparticles: Health impacts? *Materials Today* **7**, 32-35.
- Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL (2006). Pulmonary Instillation Studies with Nanoscale TiO₂ Rods and Dots in Rats: Toxicity is not Dependent upon Particle Size and Surface Area *Toxicol Sci* **91**, 227-236.
- Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V (2002). Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* **184** 172-179.
- Yates DE, Healy TW (1980) Titanium dioxide–electrolyte interface. Part 2—Surface charge (titration) studies. *J Chem Soc, Faraday Trans. I* **76**, 9-18.
- Yongli C, Xiufang Z, Yandao G, Nanming Z, Tingying Z, Xinqi S (1999). Conformational Changes of Fibrinogen Adsorption onto Hydroxyapatite and Titanium Oxide Nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* **214**, 38-45.
- Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, Nakakuki K, Kohyama N, Donaldson K (1998). Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *J Toxicol Environ Health A* **53**, 423-38.
- Zhou YM, Zhong CY, Kennedy IM, Pinkerton KE (2003). Pulmonary responses of acute exposure to ultrafine iron particles in healthy adult rats. *Environ Toxicol* **18(4)** 227-235.
- Zielinski H, Mudway IS, Bérubé KA, Murphy S, Richards R, Kelly FJ (1999). Modeling the interactions of particulates with epithelial lining fluid antioxidants. *AJP Lung* **277**, 719-726.

2. Étude critique du rôle des paramètres physiques dans l'activité biologique

M-C. Jaurand

Introduction

L'une des questions posées par la caractérisation des expositions aux particules ultra-fines (PUF) et l'évaluation de leurs effets physiopathologiques chez l'homme porte sur la nature des paramètres de ces particules à prendre en considération pour relier l'effet observé à la dose et, le cas échéant, pour comparer entre eux les effets de différentes particules. Cette connaissance est également importante pour la définition de doses limites d'exposition.

Les PUF représentent un ensemble de particules très hétérogène, tant en raison de la diversité de leur composition chimique (substances carbonées, métaux, gaz adsorbés...), que de celle de leur forme physique (morphologie, dimensions) et de leur structure (cristallinité...). En outre, des PUF données représentent, elles-mêmes, un sous-ensemble dont l'hétérogénéité est très variable, selon qu'il s'agit de particules simples ou de mélanges provenant de fumées d'origines diverses. S'il est légitime de vouloir trouver un paramètre fédérateur pour rendre compte des effets pathogènes et pour définir des valeurs tolérables d'exposition, afin de limiter les effets sur la santé, il est nécessaire de disposer de données solides et objectives sur les relations « dose-effet » de ces composés, ainsi que sur la nature des paramètres des particules responsables de la toxicité, pour les principaux mécanismes d'action relatifs aux pathologies d'intérêt. Pour aider à résoudre cette question, ou pour y apporter des éléments de réponse, les études expérimentales sont d'un intérêt capital.

Cette partie vise à recenser et à analyser certaines études effectuées dans le cadre de recherches en relation avec les effets physiopathologiques des PUF. Pour cela, deux aspects majeurs doivent être pris en considération : d'une part l'origine et les champs d'application de ces particules, car cela conditionne les voies d'exposition à ces particules ; d'autre part, le type de lésions ou de pathologies qu'elles sont susceptibles de provoquer, ce qui permet de définir la pertinence et les limites des modèles ou systèmes expérimentaux employés. Dans les paragraphes suivants, les différents types de PUF susceptibles d'être rencontrés dans l'environnement seront mentionnés, afin de définir les cibles potentielles dans l'organisme. Les effets connus ou suspectés sur la santé seront résumés, dans le but de déterminer les mécanismes à appréhender pour rendre compte des effets physiopathologiques.

2.1. Contexte des études toxicologiques visant à déterminer les paramètres des PUF pertinents pour l'évaluation de leurs effets physiopathologiques

2.1.1. Cibles potentielles des PUF dans l'organisme

La très grande majorité des PUF rencontrées dans l'environnement général concerne les particules atmosphériques générées par les produits de combustion de moteurs et de fumées d'usine et, dans l'environnement professionnel, des types de particules spécifiques de l'activité industrielle (voir chapitre 2, point 3). Qu'elles soient rencontrées en milieu du travail ou dans l'environnement général, la principale voie d'accès est la voie aérienne. Le poumon et les cellules pulmonaires seront donc principalement affectés par l'exposition à des PUF toxiques. En outre, des études précédemment réalisées ont montré une translocation de ces particules dans d'autres compartiments, tels que les vaisseaux ou le cerveau (Borm et Kreyling, 2004 ; Dorman et coll., 2002 ; Oberdörster et coll., 2002, 2004 ; Takenaka et coll., 2004). Des particules ont été également détectées dans le foie et leur présence dans le tractus digestif également suggérée. En effet, chez l'homme, l'inhalation de particules de carbone marquées au (99m)technécium, d'une dimension inférieure à 100 nm, ou de particules d'iridium 192 (15-20 nm) a montré un passage dans la circulation et dans différents organes (Nemmar et coll., 2002 ; Semmler et coll., 2004).

Le développement des nanotechnologies a fait apparaître de nombreuses autres sortes de nanoparticules. Celles-ci sont développées pour des applications aussi diverses que des utilisations dans l'industrie (Mazzola, 2003 ; Paull et coll., 2003) ou le domaine médical, pour la mise à disposition de doses thérapeutiques, localement, par exemple pour le traitement de cancer (Hirsch et coll., 2003) ou pour le transfert de gènes à des fins thérapeutiques (Chen et coll., 2003). D'autres applications, dans le domaine de la détection de l'ADN ou la visualisation de protéines dans les cellules, sont également envisagées (Bailey et coll., 2003 ; Cognet et coll., 2003). De ce fait, si l'inhalation reste la voie d'exposition privilégiée, d'autres voies ne doivent pas être négligées ; en conséquence, il est à considérer que le poumon n'est pas le seul organe susceptible d'être un site de rétention des PUF.

2.1.2. Pathologies relatives à l'exposition aux PUF

Les études épidémiologiques ont clairement montré une augmentation de la morbidité cardiovasculaire et respiratoire, et de la mortalité, chez des sujets sensibles lors de pics

de pollution (voir chapitre 4 point 2). Les causes de mortalité sont, pour partie, dues à des manifestations cardiovasculaires (infarctus ou autre ischémie aiguë du myocarde), suggérant que certains agents de la pollution atmosphérique pourraient jouer un rôle dans ces mécanismes physiopathologiques (Pekkanen et coll., 2002 ; Peters et coll., 2001). Au niveau de l'appareil respiratoire, les manifestations allergiques (rhinite, asthme...) et les maladies chroniques obstructives (BPCO) représentent d'autres atteintes fréquemment associées à la pollution (Nemmar et coll., 2004). De plus, l'exposition à des polluants atmosphériques est également suspectée de participer à une augmentation de l'incidence du cancer bronchopulmonaire (CBP ; Alberg et coll., 2005). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont posé la question d'une relation éventuelle entre pathologies neurodégénératives et exposition à des PUF (Calderon-Garciduenas et coll., 2002 ; Campbell et coll., 2005).

D'après ces observations, les pathologies à étudier sont donc en priorité l'asthme et les BPCO, les pathologies cardiovasculaires en relation avec la thrombose, ainsi que le cancer. Pour ce qui concerne les autres pathologies, s'il est difficile aujourd'hui de les définir, il faut réfléchir aux effets potentiels qui pourraient être attribués aux PUF. Divers mécanismes seront à prendre en considération ; ils portent plus particulièrement sur les mécanismes biologiques et dynamiques de l'inflammation, la coagulation, la génotoxicité et la translocation des particules.

2.1.3. Nature des études expérimentales : mécanismes d'action relatifs aux pathologies potentielles

Les études expérimentales destinées à évaluer les effets et les mécanismes d'action de PUF ont porté sur des composés aussi différents que des particules de dioxyde de titane (TiO_2), de noir de carbone (CB), de polystyrène, de métaux ou sels métalliques, de fumées de diesel ou des particules de l'air ambiant.

De nombreuses approches ont été employées pour aborder la connaissance des effets chez des animaux ou sur des cellules exposées aux PUF :

- par l'évaluation de paramètres associés à la réaction inflammatoire : afflux de cellules *in vivo* et production de facteurs inflammatoires *in vivo*, chez l'animal, par l'analyse du lavage broncho-alvéolaire et, *in vitro*, sur cellules en culture ;
- par l'étude de la thrombogenèse (formation du caillot, agrégation plaquettaire...) ;
- par la recherche d'altérations de l'ADN et des chromosomes, indicatrices d'un potentiel génotoxique ;
- au moyen de l'étude de la translocation et de la migration des particules.

Dans ce contexte, les effets ont été reliés à la concentration massique, au nombre, à la surface, et/ou à l'activité de surface des particules.

Les tests d'évaluation des effets rapportés dans la littérature sont de nature variée. On trouvera plus loin des informations détaillées et les références sur ces différentes approches. Les différents types d'études effectuées sont résumés ci-après.

Dans le domaine de l'inflammation, les études portant sur la détermination de l'afflux de cellules inflammatoires dans le poumon, essentiellement polynucléaires neutrophiles (PMN) obtenus par lavage broncho-alvéolaire (LBA), sont très nombreuses. La quantification du recrutement de macrophages a été aussi étudiée, ainsi que la production de molécules impliquées dans la réponse inflammatoire, telles que les cytokines : interleukines (IL-1- β , IL-6, IL-8) et TNF- α (*Tumour Necrosis Factor α*) ou des facteurs tels que MIP-2 (*Macrophage Inflammatory Protein-2*). Des paramètres rendant compte du contenu en facteurs jouant un rôle dans la protection contre les oxydants (rapport entre les formes réduite et oxydée du glutathion ; activité d'enzymes : glutathion peroxydase) ont été également évalués.

Outre la quantification des macrophages alvéolaires, certaines de leurs fonctions ont été déterminées : capacité à phagocyter les levures ou des particules telles que le latex, production d'une « bouffée oxydante » ; production d'immunoglobulines (IgE ; IgG₁) ; propriétés mécaniques, déterminées en magnétométrie. De même que dans le LBA, les niveaux de GSH et GSSG (formes oxydée ou réduite du glutathion) ont été étudiés dans ces cellules, après exposition à des particules, ainsi que l'effet de facteurs jouant un rôle dans l'inflammation : induction de iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthetase*), expression de COX2 (*Cyclo-Oxygenase 2*), de HO (*Heme Oxygenase 1*) ou de prostaglandines. La réponse de ces cellules au stress a été également évaluée par la détermination de l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*).

D'une manière plus générale, les études sur cellules, qu'il s'agisse de macrophages ou non, ont évalué la cytotoxicité des particules soit en déterminant la viabilité (perméabilité de la membrane cellulaire, activité des enzymes mitochondriales, morphologie ultrastructurale), soit par la détermination de l'apoptose (morphologie nucléaire, activité de caspases).

Dans le cadre de l'exposition d'animaux par voie intratrachéale ou par inhalation, des analyses ont porté sur les cellules épithéliales pulmonaires, par la détermination de la prolifération et, en relation avec des processus de fibrogenèse, par la production de procollagène ou d'hydroxyproline ; par l'activation de NF- κ B et la production de TGF- β (*Transforming Growth Factor β*). La contraction d'un réseau de collagène par des fibroblastes, dans un système tridimensionnel *in vitro*, a également été évaluée dans quelques travaux. Cette approche est utilisée en tant que modèle du remodelage tissulaire, phénomène utile à la réparation des lésions tissulaires.

La réaction immune a été étudiée dans le contexte d'animaux « normaux » ou d'animaux sensibilisés aux allergènes (par exemple par prétraitement à l'ovalbumine). Les paramètres étudiés pour déterminer la réponse aux particules étaient divers :

recrutement de lymphocytes, présentation d'antigènes, production d'IgE, niveaux de GSH de différents types cellulaires.

Très peu de travaux ont porté sur les effets génotoxiques potentiels de ces particules ; il existe seulement quelques rares études sur les altérations de l'ADN de cellules pulmonaires, après exposition par inhalation ou sur des systèmes de cellules en culture ou acellulaires.

2.2. Bilan des données expérimentales sur le(s) paramètre(s) les plus représentatifs de l'effet observé (rôle de la surface, de la masse, du nombre)

2.2.1. Travaux présentant des données expérimentales sur les relations effets/surface

Dans la mesure où ces données sont mentionnées dans les articles examinés, il sera distingué entre aire (surface calculée à partir des paramètres des particules, exprimée en cm^2) et surface spécifique (surface mesurée par la méthode BET, exprimée en m^2/g). Pour certaines particules, ces surfaces ne sont pas nécessairement équivalentes. Par exemple, la désorption de molécules adsorbées à la surface des particules de diesel entraîne une augmentation de la surface spécifique. Enfin, ces paramètres peuvent évoluer de façons différentes lors de la coalescence des particules.

Plusieurs travaux indiquent une relation entre l'aire développée par la quantité de particules à laquelle les sujets, animaux ou cellules, ont été exposés et les effets biologiques. Ces derniers se déclinent en termes de mortalité chez l'homme, d'effets en relation avec une réponse inflammatoire pulmonaire *in vivo* (nombre de PMN) ou *in vitro* (réponse de cellules en culture), d'accroissement de la perméabilité vasculaire, de développement de tumeurs expérimentales. Il est à noter que, pour des particules individualisées de nature donnée, aire, nombre et masse sont liés, car la distribution en tailles est constante au-dessous d'un seuil critique de concentration (Maynard et Maynard 2002).

Maynard et Maynard (2002) ont testé un modèle mathématique pour relier la quantité de particules à l'aire développée par ces particules (diamètre moyen en nombre 50 nm, $\sigma_g = 1,7$ et taux de génération : 10^7 particules/ m^3/s). Ces auteurs ont confirmé les hypothèses selon lesquelles, à faible concentration, la coagulation des particules est négligeable, conduisant à une relation linéaire entre la surface et la masse. En revanche, à forte concentration, la coagulation devient prédominante et la relation entre ces deux paramètres devient curvilinéaire. Ce modèle mathématique a été appliqué à des données historiques de mortalité pour lesquelles on connaissait la concentration

massique en particules de l'air ambiant. Une relation linéaire entre mortalité et aire des particules a été mise en évidence.

Les résultats d'autres travaux vont dans le même sens. Une relation linéaire entre le nombre de PMN présents dans le LBA et l'aire des particules instillées a été observée par Donaldson et coll. (2002). Ces auteurs ont instillé différentes particules : TiO_2 , noir de carbone et latex, chez le rat. Aucune relation n'était observée lorsque les données étaient corrélées avec la masse. Dans un autre travail, après exposition de rats, par instillation intratrachéale, à des particules de TiO_2 , fin ($10 \text{ m}^2/\text{g}$) ou ultra-fin ($50 \text{ m}^2/\text{g}$), une relation quasi linéaire a été décrite entre l'aire (cm^2) des particules instillées et l'augmentation du pourcentage d'enzymes présentes dans le LBA, par rapport au contrôle non exposé (Höhr et coll., 2002).

Les particules d'oxyde de titane ont fait l'objet de différentes études. Dans une revue antérieure, Oberdörster (1996) a rapporté une comparaison entre les activités de particules d'oxyde de titane (anatase et rutile) de différentes dimensions : 20 nm ou 250 nm (anatase) et 12 nm ou 220 nm (rutile), ainsi que du noir de carbone. L'auteur conclut que les données du LBA sont mieux corrélées avec la surface des particules retenues dans le poumon qu'avec leur masse, leur volume ou leur nombre. L'analyse des relations entre aire des particules et différents paramètres du LBA montre une bonne corrélation entre la quantité de protéines du LBA et la surface des particules retenues dans le poumon. Cependant, contrairement à ce qui est observé par Donaldson et coll. (2002), il n'y a pas vraiment de corrélation avec le nombre de PMN. Plus récemment, Oberdörster (2001) a, dans une autre revue, repris les résultats d'articles antérieurs sur l'afflux de PMN consécutif à une instillation intratrachéale de TiO_2 dans le poumon de rat et observé une relation, cependant non linéaire, entre ce paramètre biologique et l'aire (cm^2) des particules instillées.

Beck-Speier et coll. (2001) ont déterminé, sur cultures de macrophages alvéolaires de chien, l'effet d'agglomérats de PUF de carbone élémentaire (diamètre : 77 nm) et de TiO_2 (diamètre : 21 nm) sur la production de métabolites inflammatoires (voie de la 5-lipoxygénase) et anti-inflammatoires (voie de la cyclooxygénase). La quantité de molécules anti-inflammatoires produite s'est trouvée doublée, par rapport aux macrophages non exposés aux particules, pour une aire équivalente de ces différentes particules. Cependant, on doit noter que seul ce point (doublement des valeurs) a été étudié. De plus, cette relation n'était pas observée pour les molécules inflammatoires ; en effet un doublement de la production était obtenu pour des surfaces différentes.

On peut également citer ici un article portant sur les effets de cristaux de quartz (diamètres : 0,5 ; 2 et 10 μm) dans lequel il est conclu que l'aire des particules semble déterminante pour la comparaison de l'activité de ces échantillons (production de IL-6 et IL-8 sur des cellules épithéliales pulmonaires A549 ; Hetland et coll., 2001b). Dans cette étude, l'aire était calculée à partir des données sur la masse. Un échantillon de microsilice

amorphe (diamètre : 0,2 μm) était également testé dans ce travail ; il a montré des effets comparables à ceux de la silice cristalline, pour les faibles concentrations.

Dans une synthèse plus récente publiée par Oberdörster (2001), un travail de Driscoll (1996) est mentionné, dans lequel une relation logarithmique a été trouvée entre le pourcentage de rats présentant une tumeur pulmonaire après exposition par inhalation à différents types de particules (TiO_2 , diesel, CB, talc) et l'aire des particules inhalées, pour une surface de rétention dans le poumon supérieure à environ 0,2 m^2 .

Si l'ensemble de ces résultats montre une tendance à considérer que l'aire des particules est un paramètre susceptible d'être pris en compte pour certains effets biologiques, on ne peut pas généraliser car les interprétations sont parfois limitées par le petit nombre de points et de types de particules étudiés. De plus, il existe des données conduisant à des conclusions différentes.

Uchino et coll (2002) n'ont pas mis en évidence de corrélation entre la viabilité de cellules ovariennes de hamster chinois et la surface (BET) de particules de TiO_2 .

Dans un article sur la stimulation de la réponse inflammatoire à court terme, après instillation intratrachéale de particules de carbone fin (CB Huber 990 ; 260 nm ; 7,9 m^2/g), et ultra fin (UfCB Printex 90 ; 14,3 nm ; 253 m^2/g) chez le rat, Li et coll. (1999) ont comparé les données obtenues en fonction de la masse, du volume et de la surface des particules instillées. Le paramètre étudié dans cette corrélation était le nombre de PMN dans le LBA. Les résultats montrent que les valeurs trouvées avec CB et UfCB étaient corrélées à ce paramètre lorsque l'expression de la quantité instillée était exprimée en fonction de la masse ou du volume, sauf avec la plus forte concentration en UfCB, nettement en dessous de la valeur attendue. Cependant, c'était la meilleure relation obtenue et, en particulier, il n'y avait aucune corrélation entre l'aire des particules et le contenu en PMN du LBA. Ces résultats peuvent sembler contradictoires par rapport à d'autres travaux et aux hypothèses formulées par Oberdörster (2001) qui avait conclu à une relation « dose-effet » unique entre l'afflux de PMN et l'aire instillée de particules de TiO_2 fin ou ultra fin. Cependant, alors que Li et coll. (1999) ont comparé les effets de CB et UfCB à surface équivalente pour chacun des échantillons, la comparaison a été effectuée pour des surfaces différentes dans le travail rapporté par Oberdörster (2001). Ainsi, dans ce cas, on ne peut exclure une divergence des relations correspondant à chaque échantillon, en particulier pour les concentrations élevées en UfCB, où il n'y avait pas de valeur proche ou équivalente en surface de particules CB.

Selon une autre approche, dans laquelle des cellules épithéliales pulmonaires A549 ont été exposées à des poussières de roche (mylonite, gabbro, basalte, feldspath), ainsi qu'à du noir de carbone (Printex 60), la différence de production de cytokines (IL-6 et IL-8) n'était pas due à des différences de surface des particules, mais plus vraisemblablement à des différences de composition chimique (composition du minéral et/ou son contenu en éléments métalliques ; Hetland et coll., 2000).

Selon ces données, il semble raisonnable de penser que, dans le domaine de la réponse inflammatoire, même s'il y a une tendance à considérer que la surface des particules représente un paramètre d'intérêt pour rendre compte des effets, il n'y a pas assez de données pour recommander son usage.

En dehors des travaux portant sur l'inflammation, quelques auteurs ont fait état de résultats sur le potentiel tumorigène de ces particules. Oberdörster (1996) mentionne que, dans un travail antérieur, s'il n'y avait pas de bonne corrélation entre la masse des particules retenues dans le poumon et la réponse pulmonaire tumorale, la relation était améliorée lorsque la charge pulmonaire était exprimée en surface. Il s'agissait là d'études utilisant différents types de particules ; cependant, un autre travail cité dans cette revue (celui d'Heinrich et coll., 1995) montrait un taux de tumeur très voisin entre TiO_2 (32 % d'animaux avec tumeur) et CB (39 % d'animaux avec tumeur) pour des surfaces de particules retenues dans le poumon différentes, respectivement 2 m^2 et 10 m^2 . Selon Oberdörster, on peut émettre l'hypothèse d'une désagrégation des particules de TiO_2 pour rester dans l'hypothèse du rôle prépondérant de l'aire des particules dans la tumorigénicité. À l'inverse, Heinrich et coll. (1995), étudiant la tumorigénicité de TiO_2 ultra-fin, de noir de carbone (14 nm) et de particules diesels, concluaient que la dose cumulée, et non l'aire, des particules retenues dans le poumon, était corrélée avec la formation de tumeurs. Ces auteurs considéraient en outre que, hors la taille et la surface, la structure cristalline, la réactivité chimique de surface, le matériel organique adsorbé et la capacité à la désagrégation sont importantes pour rendre compte des effets.

L'ensemble de ces résultats portant sur l'étude des relations entre l'activité et l'aire des particules montre qu'il n'y a pas de données consensuelles en faveur du rôle de l'aire comme paramètre fiable pour rendre compte de l'activité des particules.

Les particules « modèles » sont d'un grand intérêt pour étudier les relations entre les effets et les caractéristiques physiques et physicochimiques des particules, car elles sont moins complexes que des particules de l'air ambiant ou de diesel.

La capacité de microbilles de polystyrène de différentes dimensions (64 nm, 202 nm et 535 nm ; aires respectives : 89,3, 28,3 et $10,7 \text{ m}^2/\text{g}$) à produire une réaction inflammatoire après instillation dans le poumon de rat a été évaluée par la détermination de paramètres cellulaires et biochimiques du LBA. Une relation linéaire entre le nombre de PMN et l'aire des particules instillée a été obtenue. Cette relation n'a pas été observée avec les autres éléments mesurés du LBA (protéines totales et LDH). Il n'y avait pas, non plus, de corrélation entre l'aire et les réponses obtenues avec des cellules en culture (afflux intracellulaire de calcium sur lignée Mono Mac 6, production d'interleukine IL-8 par la lignée épithéliale A549 ; Brown et coll., 2001).

Dans un autre travail, portant sur les modifications de la fonction vasculaire par des particules de polystyrène, fines ou ultra-fines, Hamoir et coll. (2003) ont utilisé des particules de polystyrène, chargées positivement (groupements aminés) ou négativement

(groupements carboxyliques), de différentes dimensions : 24, 110 et 190 nm de diamètre (surfaces spécifiques respectives 235,2, 51,3 et 30,1 m²/g). L'accroissement de la perméabilité vasculaire était étudié après instillation des particules dans un modèle de poumon de lapin isolé et perfusé. Les effets ont été corrélés à différents paramètres des particules : aire, nombre et masse instillée. Les auteurs ont observé une corrélation statistiquement significative entre la réponse biologique et l'aire des particules, ainsi qu'avec le nombre de particules. Dans l'un des essais, la perméabilité microvasculaire était à peine modifiée pour un même nombre de particules chargées négativement, de tailles différentes (24 ou 110 nm), alors que leurs surfaces étaient dans un rapport 20, ce qui peut s'interpréter comme le signe d'une plus grande importance du nombre des particules que de leur surface ; à noter qu'il s'agit dans ce cas de charges négatives. Une relation significative était également observée avec la masse, mais avec un plus faible degré de signification.

Parmi les travaux où les résultats sur les effets biologiques ont été donnés en relation avec la surface spécifique, mesurée par la méthode BET, on trouve des données sur les fonctions macrophagiques et la tumorigénicité expérimentale.

Les effets sur la fonction macrophagique de différents types de particules, de surface spécifique (BET) allant de 6 à 600 m²/g, ont été étudiés par Möller et coll. (2002). Les auteurs ont déterminé, sur des macrophages de chien et sur une lignée macrophagique (J774A), la fonction du cytosquelette, la capacité des cellules à phagocyter des microbilles de latex de 1 µm de diamètre, ainsi que l'apoptose. Cinq types de particules fines et ultra-fines ont été utilisés : TiO₂, carbone élémentaire, noir de carbone commercial, diesel et particules de l'air urbain. Aucune relation n'a été observée entre la surface spécifique et les effets.

Lison et coll. (1997) ont déterminé l'effet d'échantillons de MnO₂ de différentes surfaces spécifiques (0,16 ; 5,5 ; 17 et 62 m²/g). L'activité des particules était évaluée *in vitro*, dans un modèle de macrophages péritonéaux de souris (cytotoxicité mesurée par la libération extracellulaire de LDH), et *in vivo*, après instillation intratrachéale des particules chez la souris (afflux cellulaire ; teneur du LBA en LDH et protéines). L'amplitude de la réponse était fonction de la surface spécifique des particules. Cependant, un échantillon fraîchement broyé était plus actif que l'échantillon non broyé, et d'une activité comparable à celle d'un échantillon de surface spécifique très supérieure. Ces résultats illustrent bien que l'on ne peut relier l'activité seulement à la surface spécifique des particules. D'autres paramètres peuvent être pris en considération ; les auteurs suggèrent que des phénomènes de dissolution peuvent jouer un rôle dans l'activité des particules.

Un autre travail associe les effets à la production de HO•. Dick et coll. (2003) ont étudié différentes PUF métalliques de cobalt (UfCo) et de nickel (UfNi), de dioxyde de titane (UfTi), ainsi que de noir de carbone (UfCB), après instillation intratrachéale chez le rat,

et dans un système acellulaire (formation de cassures dans l'ADN plasmidique). Les particules ultra-fines métalliques avaient des surfaces spécifiques (BET) voisines (≈ 36 à $50 \text{ m}^2/\text{g}$) alors que celle de l'UfCB était de $253,9 \text{ m}^2/\text{g}$. Il n'y avait pas de relation entre l'effet inflammatoire (afflux de PMN, paramètres biochimiques du LBA) et la surface spécifique, ni avec la diminution de la quantité d'ADN superenroulé.

De même, une relation entre le pourcentage d'animaux présentant des tumeurs et la surface spécifique de particules n'a pu être mise en évidence par Dasenbrock et coll. (1996), qui ont instillé des particules de diesel (diamètre aérodynamique médian $0,25 \mu\text{m}$; $12 \text{ m}^2/\text{g}$) et de CB : Printex 90TM (14 nm ; $300 \text{ m}^2/\text{g}$) et de Lamp Black101TM (95 nm ; $20 \text{ m}^2/\text{g}$), après extraction des composés organiques. Ce traitement modifiait peu la surface spécifique des échantillons de CB, mais les particules de diesel présentaient une surface spécifique fortement augmentée ($138 \text{ m}^2/\text{g}$). Les particules de Printex 90TM produisaient le taux le plus élevé de tumeurs pulmonaires (21 %), comparativement aux particules Lamp Black101TM utilisées à la même dose (8 %). Cependant, les particules de diesel étaient peu tumorigènes (4 %) en dépit d'une surface spécifique élevée. Ces résultats indiquent que le seul paramètre surface spécifique BET ne rend pas compte des effets cancérogènes des particules chez le rat.

On constate que des relations significatives entre les effets des particules et la concentration massique sont le plus souvent observées lorsque les résultats se rapportent à un seul type de particule ; on peut toutefois citer quelques travaux indiquant une relation, sur la base de l'utilisation de différents types de particules.

Hetland et coll. (2000) ont observé, sur cultures de cellules épithéliales pulmonaires A549, que la production d'IL-8, ainsi que le potentiel apoptotique de particules de l'air ambiant « grossières », fines ou ultra-fines était équivalent, à concentration massique équivalente. Cependant, des différences étaient observées concernant la production d'IL-6, les particules fines étant les plus actives. Par ailleurs, une réponse différente était obtenue avec des cellules alvéolaires de type 2 : activité la plus importante avec la fraction grossière, absence d'effet de la fraction ultra-fine. Ces observations soulignent la spécificité des effets selon le système d'évaluation, ce qui est un frein à une généralisation des résultats.

Étudiant la fonction vasculaire dans un modèle d'aorte de rat isolée (et provenant de rats hypertendus pour modéliser la situation humaine d'un risque cardiovasculaire accru par l'exposition aux PUF), Bagate et coll. (2004) ont observé une relation linéaire entre la vasorelaxation et la concentration, exprimée en $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les particules consistaient en particules d'air urbain (ECH-93) et de CB (44 nm) chargé ou non en fer (Fe^{II}) et en vanadium (V^{IV}). Toutefois, la relation « dose-effet » était différente entre les différents types de particules, ce qui ne permet pas une généralisation.

Allant dans le même sens, dans une étude où des cultures de macrophages alvéolaires de rat ont été exposées à des particules de noir de carbone ultra-fin (UfCB), une

corrélation était observée entre la quantité de TNF- α produite et la concentration massique en UfCB (Brown et coll., 2004).

Une critique de l'expression sous forme de « masse » a été formulée par Ghio et Devlin (2001). Ces auteurs, disposant de différents échantillons de particules d'air ambiant, recueillies sur filtres à des moments différents, et associées à une morbidité différente, ont exposé des volontaires sains par instillation pulmonaire à une concentration massique donnée d'extraits aqueux de particules. Après exposition et lavage broncho-alvéolaire, l'étude de paramètres LBA liés à la réponse inflammatoire a montré des différences de réponse selon les particules, en dépit de concentrations massiques équivalentes, soulignant que des paramètres autres que la masse doivent être pris en considération pour corrélérer aux effets. Toutefois, il s'agit d'études effectuées chez l'homme, dans lesquelles des variations inter-individus potentielles doivent être considérées.

D'autres travaux peuvent être ici cités. Gallagher et coll. (2003) et Li et coll. (2003) ont étudié l'effet de particules fines ou ultra-fines de carbone et de particules de l'air ambiant sur la réponse inflammatoire (population cellulaire dans le LBA). Les auteurs concluent que la masse n'est pas en lien avec les effets et que la surface serait un meilleur paramètre. Cependant, il n'y a pas ici d'étude de corrélation et pas d'argument pour sélectionner la surface plutôt que la taille ou le nombre.

S'il résulte de tous ces travaux que plusieurs données indiquent une relation entre l'aire des particules et certains effets biologiques, cette relation est loin d'être la règle. Aujourd'hui, il n'y a pas suffisamment d'évidence pour généraliser cette notion à tout type de particule et à tout type d'effet. D'après les données de la littérature, il semble que cette relation se limite à des particules faiblement concentrées et non complexes car, dans les études répertoriées, ces particules sont le plus souvent des particules de référence. Avec des particules complexes telles celles de l'air ambiant, qui véhiculent des éléments adsorbés, il n'y a que très peu d'arguments pour traiter les données selon ces critères. Sur le plan de la réponse biologique, une corrélation avec la surface totale ne pourrait être, le cas échéant, proposée que lorsque l'on se réfère à l'afflux de PMN dans le poumon. Or, il ne s'agit là que d'une étape précoce du processus physiopathologique susceptible d'être associé à l'exposition aux PUF. De plus, les mécanismes associés à la réponse inflammatoire ne sont pas les seuls à avoir un rôle potentiel toxique, en particulier si l'on se réfère à des effets cancérogènes. D'autres paramètres biochimiques ou cellulaires ne répondent pas à cette relation et certains travaux démontrent même que cette relation n'est pas applicable. Enfin, il faut souligner que les corrélations étudiées par les différents auteurs sont limitées à la réponse du poumon et des cellules pulmonaires et, en moindre nombre, aux effets vasculaires. Compte tenu de la migration possible des PUF dans différents organes, des études plus standardisées semblent nécessaires si l'on veut répondre objectivement à la question posée et ne pas se limiter aux effets sur l'appareil respiratoire.

2.2.2. Études comparant les effets selon différents paramètres relatifs à la surface

Les PUF présentent un ensemble complexe de caractéristiques, en particulier en raison de la présence de métaux et de molécules organiques adsorbées et, pour certaines d'entre elles, d'endotoxines. En outre, des propriétés physicochimiques de surface telles que la charge, l'hydrophobie ou l'hydrophilie conditionnent les interactions avec le milieu extracellulaire et avec les cellules (voir le point 1 de ce chapitre). Dans l'hypothèse selon laquelle les effets pourraient être reliés à la surface, il convient de déterminer le rôle de la nature de la surface en termes de mécanisme d'action. La notion de réactivité de surface est indissociable de ces éléments. En effet, plusieurs interprétations peuvent être données, concernant les effets, selon que l'activité des molécules ou des éléments véhiculés par les particules ont eux-mêmes un potentiel actif. S'il n'est pas possible, d'après les données actuelles de la littérature, d'établir clairement si les effets attribués à la surface relèvent de la présence de ces composés, on dispose toutefois de notions permettant d'évaluer l'importance de ces paramètres pour la réponse biologique aux particules. Les études comparatives sont mentionnées ci-dessous.

| Rôle de la nature de la surface : conséquences d'une exposition à des particules hydrophiles ou hydrophobes ; chargées positivement ou négativement

Selon Höhr et coll. (2002), le statut hydrophile ou hydrophobe (obtenu par méthylation) de la surface de particules de TiO_2 , fin ou ultra-fin, introduites par instillation intratrachéale chez le rat n'a pas eu d'incidence sur les paramètres cellulaires et biochimiques du LBA : les effets observés n'étaient pas significativement différents entre les deux types de particules. Cependant, la méthylation n'a intéressé que la moitié des groupements OH de surface, ce qui peut limiter les effets potentiels de ce traitement de surface. En revanche, toujours utilisant des PUF d'oxyde de titane, selon un protocole d'instillation intratrachéale chez le rat, Warheit et coll. (2003) ont observé que les particules hydrophiles, contrairement aux particules hydrophobes (traitement de surface au triéthoxyoctylsilane), produisaient une réponse inflammatoire, sur la base de la mise en évidence de biomarqueurs du LBA et de critères histopathologiques. Les raisons de ces différences ne sont pas connues ; on peut formuler l'hypothèse qu'elles sont dues aux différences de traitement des particules.

Rehn et coll. (2003) ont étudié les paramètres cellulaires et biochimiques du LLBA après instillation intratrachéale, chez le rat, de TiO_2 d'un diamètre de 20 nm, hydrophile

(non traité) ou hydrophobe (traitement au triméthoxyoctylsilane). Les auteurs ont observé une inflammation transitoire, sans qu'une différence ait pu être observée entre les activités de ces deux types de particules. Ces résultats ne sont pas en faveur d'un effet de la nature de la surface ; on ignore toutefois quelle proportion des sites hydrophiles a été modifiée.

Selon les données obtenues par différents auteurs, la charge des particules influence la réponse cellulaire ; un effet des particules chargées positivement est généralement observé, alors que les particules chargées négativement n'induisent qu'une réponse faible, voire nulle. Là encore, ce sont des mécanismes liés à la réponse inflammatoire qui ont été le plus souvent analysés.

On peut mentionner ici un travail de Ogawara et coll. (2001) qui a porté sur la diffusion de microsphères de polystyrène recouvertes ou non de lécithine, après administration intraveineuse. Les auteurs ont étudié l'hydrophobicité de ces particules en milieu sérique ; ils ont constaté une adsorption différente des protéines sériques entre ces deux types de microparticules. Les conclusions de ce travail sont que la biodisponibilité *in vivo* de ces particules n'est pas due à leur différence d'hydrophobicité dans le sang, mais à des différences dans le type de protéines sériques associées. Ces résultats suggèrent également que, pour interpréter les résultats visant à définir le rôle de l'hydrophobicité des particules, on doit prendre en compte la voie d'exposition. En effet, on peut envisager que les modifications apportées à des particules dans un environnement bronchique ou alvéolaire seront différentes de celles observées dans un environnement sérique.

La charge des particules semble être un facteur susceptible de modifier la fonction vasculaire. Étudiant la thrombose vasculaire, après instillation intratrachéale, chez le hamster, de particules de polystyrène (taille : 60 nm) chargées positivement ou négativement, Nemmar et coll. (2004) ont constaté que seules les particules positives favorisaient la thrombose. Des particules chargées positivement, mais d'une taille de 400 nm, n'induisaient pas de thrombose mais une inflammation (également produite par des particules de 60 nm).

L'accroissement de la perméabilité vasculaire provoquée par des particules de polystyrène de différentes dimensions, dans le modèle de poumon de lapin isolé et perfusé mentionné précédemment, a montré que les particules chargées positivement étaient beaucoup plus actives que les particules chargées négativement (Hamoir et coll., 2003).

Il est impératif de souligner ici que la réponse cellulaire est conditionnée par un paramètre important : la quantité de particules internalisées par les cellules. Ce paramètre est généralement non pris en considération pour comparer les réponses entre différents types de particules. Cependant, l'internalisation de particules passe par une interaction avec la membrane cellulaire et peut être modulée par sa charge de surface et sa composition protéique et lipidique. La raison majeure de la non-prise en considération de ce facteur est la difficulté qu'il y a à le mesurer. Cependant, sa connaissance serait utile,

surtout dans le domaine de l'interprétation des différences d'activité entre des particules dont la surface a été modifiée. Schins (2002) a constaté que le traitement de surface de quartz par du lactate d'aluminium ou du polyvinyl-N-oxyde diminuait la quantité de particules internalisées par des cellules épithéliales pulmonaires A549 avec, pour conséquence, une diminution corrélée du nombre de cassures d'ADN. L'influence du traitement de surface sur la toxicité a été étudiée de longue date avec des cristaux de quartz. Un traitement au PVPNO s'accompagne d'une diminution de la toxicité (Ernst et coll. 2002). La fonction endocytaire de ces cellules n'est pas limitée au quartz puisque la phagocytose de PUF de TiO_2 (diamètre : 50 nm) a été par ailleurs démontrée (Stearns et coll., 2001). Grâce à l'utilisation de la cytométrie de flux, certains auteurs ont pu approcher une quantification de la phagocytose, en utilisant le paramètre *Right Angle Scatter* (RAS, dispersion lumineuse à angle droit) qui détermine la granularité cellulaire. Ce paramètre est modifié par la présence de particules solides à l'intérieur des cellules. Imrich et coll. (2000) ont ainsi étudié des macrophages alvéolaires de rat exposés à différents types de particules de l'air ambiant ; ils ont pu établir une corrélation positive entre la quantité de particules ingérée par les cellules et la production de $\text{TNF-}\alpha$ et de MIP-2, et une corrélation négative avec la viabilité cellulaire.

| Rôle des éléments adsorbés : métaux

Le rôle de métaux dans la réponse biologique a été mis en évidence par différentes études portant sur la détermination de la réponse inflammatoire, de la fonction vasculaire et de la fibrose. Toutefois, il n'y a pas de consensus pour faire jouer à l'un d'entre eux un rôle prépondérant. De plus, il peut y avoir un impact négatif (effet protecteur) ou, au contraire, parfois synergique, dans le cas d'association de plusieurs métaux.

Le rôle de métaux de transition dans la réponse inflammatoire est soutenu par Molinelli et coll. (2002) qui, testant des extraits aqueux de particules de l'air ambiant sur des cultures de cellules bronchiques, BEAS-2B, ont observé que l'augmentation de la production de cytokines était inhibée lorsque l'extrait était traité par un agent supprimant les cations métalliques.

Dans un autre type de travail, l'activité inflammatoire de fumées de soudage lavées s'est révélée moindre que celle des particules non lavées, *in vitro* (cellules épithéliales pulmonaires A549 ; McNeilly et coll., 2004), comme *in vivo* (instillation pulmonaire chez le rat ; McNeilly et coll., 2005). De plus, une activité était observée avec la fraction soluble, et la chélation des métaux de la fraction soluble atténuait son activité. L'activité était accompagnée d'une production d'espèces activées de l'oxygène (EAO) par les cellules, suggérant que les effets étaient, du moins partiellement, médiés par des oxydants.

Dans leur étude sur la fonction vasculaire, en réponse à des particules de l'air urbain (ECH-93) et de noir de carbone (44 nm) chargées ou non en fer (Fe^{II}) et en vanadium (V^{IV}), Bagate et coll. (2004) considèrent qu'il y a un effet direct des métaux de transition présents dans le sang, et qu'ils exercent un effet sur la vasorelaxation de l'aorte de rat.

Le rôle des métaux pourrait dépendre du type de particule étudié. L'exposition d'explants de trachée de rats à des particules fines de l'air ambiant (EHC93) ou de diesel a pour effet d'induire des gènes impliqués dans la fibrogenèse (production d'hydroxyproline et de procollagène ; Dai et coll., 2003). Alors que le mécanisme d'action semble passer par une voie impliquant des oxydants et le fer, pour les particules EHC93, le fer ne semble pas jouer un rôle dans le mode d'action des particules de diesel.

Certains auteurs ont proposé des conclusions différentes. Imrich et coll. (2000) ont étudié les effets biologiques de particules de l'air urbain ($\text{PM}_{2,5}$: 0,1-2,5 μm) sur des macrophages alvéolaires de rat (production de $\text{TNF-}\alpha$ et de MIP-2). Les échantillons étaient traités par diverses solutions (eau, acides) et par la deferroxamine. Les résultats ont montré que les effets résultaient de la partie insoluble. Dans le même ordre de résultats, pour MacNee et Donaldson (2003), les effets de PUF de carbone ne passent pas par l'intermédiaire de métaux de transition ; en revanche, avec des particules PM_{10} , une diminution de la production d'EAO est obtenue par les chélateurs de métaux.

D'autres auteurs ont étudié les conséquences d'une chélation ou d'une dissolution d'éléments métalliques. Brown et coll. (2000) ont traité des particules de CB et UfCB par un agent chélateur (desféral) ou par une solution aqueuse qui libère différents éléments métalliques tels que Cu, Ni, Zn et, seulement en présence de citrate, Fe. En étudiant la réponse inflammatoire après instillation intratrachéale des particules chez le rat, les auteurs ont constaté que l'effet ne pouvait pas être diminué par le traitement au desféral, et que les solutés étaient dépourvus d'activité inflammatoire. On peut conclure que, dans ce cas, l'activité observée n'était pas due aux métaux de transition.

Une stratégie différente, consistant à ajouter des sels métalliques aux particules, afin de déterminer la potentialisation des effets a été employée par plusieurs auteurs. Là encore, les résultats diffèrent selon le type de particules et de cellules. Dai et coll. (2002) ont chargé des particules de TiO_2 (anatase, diamètre géométrique moyen : 120 nm) en fer, et étudié les effets dans leur modèle d'explants de trachée. Seules les particules chargées exerçaient une activité. Wilson et coll. (2002) ont ajouté des sels ferreux (FeSO_4) et ferriques (FeCl_3), ainsi que du CuSO_4 à des particules de noir de carbone fin (CB : 260 nm) ou ultra-fin (UfCB : 14 nm). Ces auteurs ont analysé le potentiel oxydatif, en milieu acellulaire (oxydation de la dichlorofluorescéine DCFH) et sur lignées de macrophages humains Mono Mac 6 (MM6) et murins (J774), ainsi que la réponse inflammatoire après instillation intratrachéale, chez le rat. Une potentialisation de l'oxydation de la DCFH était observée seulement avec UfCB. Sur les macrophages, une potentialisation était mise en évidence seulement avec les cellules J774, en

présence de UfCB et d'une forte concentration de FeSO_4 . L'absence de potentialisation observée avec des macrophages humains pourrait résulter de la capacité de ces cellules à capter le fer, le rendant ainsi indisponible pour les réactions d'oxydoréduction. Par ailleurs, la réponse inflammatoire *in vivo* était potentialisée en présence du mélange UfCB et FeCl_3 .

Plusieurs auteurs ont directement étudié les effets de sels métalliques sur les systèmes expérimentaux développés pour étudier les effets des PUF. L'impact des métaux et de l'activité rédox dans l'inflammation a été abordé par Riley et coll. (2003) sur cellules épithéliales de rat (RLE-6TN) par la détermination de la viabilité cellulaire et de la sécrétion de cytokines. Les métaux, sous forme de chlorures, seuls ou en combinaison, avaient une activité différente, selon l'ordre suivant : $\text{V} > \text{Zn} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Fe}$. Un impact additif ou négatif était observé dans le cas d'association de plusieurs métaux. Graff et coll. (2004) ont observé une stimulation de la fonction de myocytes exposés à des sels de Zn et V, choisis en raison de la présence fréquente de ces métaux dans les particules de l'air ambiant. Selon la même approche, mais avec un moyen d'étude différent, portant sur l'analyse du LBA et sur la stimulation de la prolifération des cellules pulmonaires, Adamson et coll. (2000) et Prieditis et Adamson (2002) ont étudié les effets de sels métalliques présents dans les particules de l'air ambiant : Zn, Cu, Al, Mg, Ni, Fe et Pb. Ces auteurs ont constaté dans ce contexte que les métaux ayant la plus grande activité inflammatoire étaient Zn et, à un moindre degré, Cu.

De même, Shi et coll. (2003), qui ont par ailleurs observé une relation entre la quantité de $\text{HO}^\bullet$ produite par des fractions « grossières » ($\text{PM}_{10-2,5}$) et fines ($\text{PM}_{2,5}$) et la formation de 8-OH-dG dans l'ADN de thymus de veau (voir ci-après), ont constaté que cette production était indépendante de la teneur en métaux (V, Cr, Fe, Ni), sauf pour le cuivre.

On peut également signaler, dans ce contexte, l'utilisation de PUF de fer (diamètre médian 72 nm) lesquelles, après inhalation, chez le rat, ne montrent qu'une très faible activité inflammatoire (Zhou et coll., 2003).

| Rôle des éléments adsorbés : composés organiques

Étant donné que des molécules organiques sont associées aux particules, et que l'on sait par ailleurs leur potentiel à produire des espèces réactives oxygénées impliquées dans des processus cancérogènes (Sorensen et coll., 2003), la connaissance de l'activité de ces molécules est indispensable pour définir la pertinence du paramètre « charge en molécules organiques » par rapport à la réponse biologique.

Un effet des extraits organosolubles a été mis en évidence par Li et coll. (2002), qui ont étudié l'effet pro-inflammatoire de particules diesels sur une lignée de macrophages

(THP-1). Allant dans le même sens d'un effet des substances organosolubles, Möller et coll. (2002), utilisant différents types de particules (TiO₂, Printex-G, Printex90, carbone, diesel, particules de l'air urbain), ont observé que les particules lavées au dichlorométhane étaient moins actives que les particules natives. Les effets observés se situaient dans le cadre d'études sur les fonctions du cytosquelette de macrophages alvéolaires de chien.

Deux articles ont comparé l'effet de particules fines ou ultra-fines de carbone (Gallagher et coll., 2003) et de particules de l'air ambiant (Li et coll., 2003), tout en évaluant le rôle des composés organiques associés. Les résultats ont montré que les effets dépendaient de la taille des particules, avec un effet des particules ultra-fines supérieur à celui des particules fines. Les auteurs concluent respectivement à une absence de rôle de composés organiques (Gallagher et coll., 2003) ou, à l'inverse, à une dépendance de l'effet, selon la teneur en composés organiques (Li et coll., 2003). Dans l'étude de Gallagher et coll. (2003), des rats ont été exposés à du noir de carbone (CB) sous deux formes : Printex-90 (16 nm, surface spécifique 300 m²/g) et Sterling V (70 nm, surface spécifique 37 m²/g). Ces deux échantillons se distinguent, outre leurs dimensions, par leurs teneurs en composés organiques, le Sterling V ayant une teneur en ces composés beaucoup plus élevée. Les paramètres étudiés étaient liés à l'inflammation (population cellulaire dans le LBA) et à la génotoxicité (formation de 8-oxodG). Dans ce travail, il a été suggéré que les HAP ne jouaient pas de rôle dans le potentiel génotoxique, puisque la particule active, sur la base de la formation de 8-oxodG dans le poumon, était la moins contaminée (Gallagher et coll., 2003). Cependant, cet argument est discutable car d'autres types de lésions de l'ADN, formation d'adduits par exemple, ne seraient pas détectés par cette méthode.

Pour déterminer l'importance relative des paramètres des particules, on doit aussi considérer que la réponse, évaluée selon un critère donné (marqueur de l'inflammation, modification d'une fonction spécifique, altération du matériel génétique, translocation...) peut présenter un lien plus spécifique avec l'un ou l'autre des paramètres associés aux particules.

Huang et coll. (2003), sur cellules bronchiques en culture BEAS-2B exposées à des particules « 1,0-2,5 µm » et « 2,5-10 µm », ont constaté que la production de cytokines dépendait du contenu en métaux, et la peroxydation lipidique de la composition élémentaire et du contenu en composés organiques. Ainsi, ces auteurs considèrent que la taille, de même que la composition, contribuent aux effets en relation avec l'inflammation.

L'activité mutagène a été déterminée sur souches de *Salmonella* ; ce test a été mis au point pour évaluer la mutagénicité de molécules organiques solubles, et est donc plus apte à rendre compte des effets liés aux contaminants organiques de surface. Avec des particules de diesel, la mutagénicité est d'autant plus élevée que les particules contiennent de composés organiques (DeMarini et coll., 2004).

| Études associant des données sur le rôle des endotoxines

Des endotoxines sont fréquemment associées aux particules d'aérosols, facteur qui doit être pris en considération pour interpréter les données sur les effets, surtout lorsqu'il s'agit de particules de l'air ambiant. Alors qu'il a été clairement montré que les endotoxines provoquaient une réponse inflammatoire, leur présence n'est pas toujours recherchée dans les échantillons. Des interprétations erronées peuvent donc être faites si ce paramètre n'est pas pris en considération. Il n'est pas rare que les études portant sur ce thème associent également une évaluation du rôle des métaux, étant donné que le traitement en milieu aqueux des particules libère à la fois les endotoxines adsorbées et certains métaux. Quelques exemples illustrent le rôle de ces agents.

Selon Osornio-Vargas et coll. (2003), la réponse inflammatoire évaluée, *in vitro*, par la production de TNF- α et d'IL-6 par la lignée monocyttaire murine J774-1, résulte de l'action d'endotoxines, comme cela est démontré par l'inhibition de l'activité au moyen d'une protéine recombinante neutralisant l'endotoxine. Il s'agissait, dans cette étude, de la comparaison d'effets de particules de l'air de la ville de Mexico : PM₁₀, fortement chargées en endotoxines, et PM_{2,5}. Alors que les échantillons de PM₁₀ induisaient une réaction inflammatoire *via* un mécanisme impliquant les endotoxines, les échantillons les moins contaminés (PM_{2,5}) induisaient une cytotoxicité et une apoptose indépendantes de la présence d'endotoxines.

Dans le travail précédemment cité de Imrich et coll. (2000), les auteurs ont démontré que la neutralisation des endotoxines provoquait une inhibition partielle de la production de TNF- α et de MIP-2 par des macrophages alvéolaires de rat exposés à différents types de particules de l'air ambiant.

De même, Huang et coll. (2002) ont conclu à un rôle possible des endotoxines contenues dans des particules fines et « grossières » sur la production de TNF- α par les cellules RAW 264.7.

Soukup et Becker (2001), étudiant les effets de la fraction soluble dans l'eau de particules de l'air ambiant, pour des catégories de dimensions PM_{2,5} et PM₁₀, sur des macrophages alvéolaires humains (production de cytokines), ont mis en évidence une contribution des endotoxines dans l'activité de cette fraction soluble. En revanche, le chélateur de métal deferoxamine était sans effet, ce qui élimine un rôle possible du fer. Dans le même ordre d'idées, Schins et coll. (2004) ont rapporté que le contenu en endotoxines de particules de l'air ambiant est, dans une comparaison semi-quantitative, corrélée au potentiel inflammatoire (afflux de PMN chez le rat exposé par instillation intratrachéale). En revanche, aucune relation n'était observée entre la production de HO[•] ou la teneur des particules en éléments métalliques.

2.3. Données expérimentales sur le rôle des radicaux libres

La production d'espèces actives dérivées de l'oxygène (EAO) par les particules est un mécanisme qui peut engendrer des effets inflammatoires, cytotoxiques et génotoxiques. Ces espèces sont formées à la surface de la particule, soit en raison de sa composition propre, soit en raison de la présence d'éléments adsorbés réactifs.

L'étude des relations entre la production d'espèces oxydantes et la surface a fait l'objet de plusieurs travaux. La production d'EAO a été également déterminée dans des systèmes acellulaires.

Dans le travail de Dick et coll. (2003), déjà mentionné, portant sur l'activité pro-inflammatoire de différentes PUF métalliques, ainsi que du noir de carbone, la production de HO• était déterminée de manière indirecte, à l'aide d'ADN plasmidique. Il n'y avait pas de relation entre l'effet inflammatoire et la diminution de la quantité d'ADN super-enroulé. Cependant, les particules les plus actives étaient celles qui produisaient le plus de dommages à l'ADN.

Barlow et coll. (2005) ont évalué la capacité de PUF de noir de carbone à activer des facteurs sériques de recrutement de macrophages. Le test consistait à évaluer l'effet chimiotactique du sérum, préalablement incubé en présence de particules, sur une lignée cellulaire murine, J774.2. Deux sortes de noir de carbone : fin (CB, 260 nm, 7,9 m²/g) ou ultra-fin (UfCB, 14 nm, 254 m²/g) étaient étudiées. Une activité faible a été observée avec CB, plus élevée avec UfCB. L'activité était réduite par l'utilisation d'antioxydants.

Utilisant des fractions « grossières » (PM_{10-2,5}) et fines (PM_{2,5}), Shi et coll. (2003) ont associé la production de HO•, déterminée par la méthode de résonance de spin (RPE), à la formation de 8-déoxyguanosine (8-OH-dG) dans l'ADN de thymus de veau et dans les cellules épithéliales pulmonaires A549. Avec l'ADN de thymus de veau, la quantité de HO• produite variait dans le même sens que la formation de 8-OH-dG (test de rang). Il est à noter que les effets en milieu acellulaire ont été étudiés en présence de H₂O₂, ce qui permet sa décomposition avec formation du radical hydroxyle, HO•, en présence de FeII, selon la réaction de Fenton. Bien que la présence de 8-OH-dG ait été détectée dans les cellules A549, il n'y a pas eu d'étude quantitative avec ces cellules.

Utilisant un système un peu particulier, dans lequel des cellules épithéliales de hamster (*Chinese Hamster Ovary*, CHO) traitées par des particules de TiO₂ de différentes dimensions (15 à 400 nm) étaient exposées à un rayonnement ultra-violet (UVA), Uchino et coll. (2002) ont observé par RPE une corrélation négative entre la viabilité cellulaire et la production de HO• par les particules dans un milieu acellulaire. Étant donné que ces auteurs n'ont pas, en outre, pu établir de corrélation entre ce dernier paramètre et la surface spécifique (BET), on ne peut pas relier, dans ce cas, la cytotoxicité à une activité de surface des particules.

Parallèlement, l'étude rapportée par Brown et coll. (2001), dans laquelle une relation linéaire entre le nombre de PMN dans le LBA et l'aire instillée de microbilles de polystyrène (dimensions : 64 nm, 202 nm et 535 nm) était observée, les auteurs n'ont pas trouvé de relation entre l'activité oxydante de ces particules, mesurée par l'oxydation de la dichlorofluorescéine (DCFH) en milieu acellulaire, et l'aire développée par les particules.

Cependant, utilisant un autre système, Kim et coll. (2003), dans leur étude visant à aborder l'évaluation de la fibrogenèse (contraction du collagène) n'ont pas pu démontrer un rôle des oxydants.

L'étude de la réponse des cellules au stress est un moyen indirect de mise en évidence de l'implication possible de réactions d'oxydoréduction dans les mécanismes d'action des particules. Dans le travail cité précédemment de Li et coll. (2003), les auteurs ont observé une induction de stress oxydatif et l'expression de HO-1 (Hème Oxygénase-1), indicateur d'une stimulation des défenses antioxydantes, dans les lignées de macrophages, RAW 264.7 et les cellules épithéliales bronchiques, BEAS-2B, exposées à une fraction ultra-fine de particules de l'air ambiant (bassin de Los Angeles). En revanche, les particules fines et grossières étaient peu ou pas actives, en accord avec une dépendance de l'activité avec la taille des particules. L'activité rédox de ces trois échantillons a été évaluée directement au moyen d'une réaction avec le dithiothréitol (DTT), qui quantifie la formation d'EAO par catalyse de quinones et témoigne donc du rôle de certains composés organiques. Une relation linéaire entre l'activité rédox des particules et l'induction de HO-1 a été d'une part démontrée, ainsi que, d'autre part, entre l'activité rédox et la quantité d'hydrocarbures polyaromatiques. Ces résultats montrent qu'il existe une relation entre la composition chimique, la capacité à produire des EAO et le stress oxydatif cellulaire. Les conclusions de ce travail paraissent contradictoires par rapport aux travaux qui excluent le rôle des composés organiques dans la génération de molécules oxydantes (Gallagher et coll., 2003). Cependant, l'évaluation du rôle des composés organiques est différente entre ces deux études (réaction avec le DTT ou formation de 8-OH-dG dans l'ADN de poumon de rat). Il faut également souligner que la présence d'endotoxines n'a pas été évaluée par Li et coll. (2003) ; or ce paramètre est important à considérer pour interpréter les résultats sur l'activité de particules de l'air ambiant.

Dans un travail antérieur, Li et coll. (2002) avaient montré, utilisant le même modèle de cellules BEAS-2B, ainsi qu'une lignée macrophagique (THP-1), que les extraits organiques (par du méthanol) de particules diesels induisaient un stress oxydatif dans ces types cellulaires, illustrant ainsi la participation des fractions polaires et aromatiques et de leurs dérivés aux réactions rédox et à la formation d'EAO. Ces auteurs montraient en outre, par l'utilisation d'inhibiteurs, que les oxydants produits par les cellules étaient différents entre les deux types cellulaires, soulignant ainsi la spécificité de réponse des cellules.

Dans leur étude sur l'activité de poussières de roches testées sur cellules épithéliales pulmonaires A549 et sur macrophages alvéolaires de rat, Hetland et coll. (2001a) ont déterminé la production de cytokines et l'oxydation intracellulaire par des solutés résultant du traitement acide ou neutre de ces particules. La réponse cellulaire (cytokines) n'était pas liée à la production d'EAO par les cellules.

Selon l'hypothèse d'un rôle des oxydants produits à la surface des particules dans les effets biologiques observés, un traitement de surface des particules, comme mentionné précédemment, devrait modifier parallèlement la quantité d'oxydants produite et les effets. Bien que des études de ce type portant sur des particules ultra-fines n'aient pas été identifiées, on trouve un travail portant sur le quartz de petite taille (diamètre moyen : 0,91 μm ; Duffin et coll., 2001). Le traitement par le lactate d'aluminium avait peu d'effet sur la taille (diamètre moyen : 1,04 μm), ni sur l'état d'agrégation, et donc peu, à masse équivalente, sur la surface des particules instillées. En revanche, le traitement diminuait à la fois la production de $\text{HO}^\bullet$, dans un système acellulaire, et l'inflammation après injection intratrachéale chez le rat (afflux de PMN ; production de MIP-2). Ces résultats vont dans le sens d'une relation entre la production d'EAO et ces effets biologiques, mais aucune relation quantitative n'a été recherchée. Par ailleurs, on sait que la quantité de particules de quartz internalisée par les macrophages est réduite par le traitement de surface, ce qui a donc des conséquences sur la réponse cellulaire (voir ci-dessus Schins 2002).

Dans une étude comparative de l'activité de quatre PUF différentes (CB, TiO_2 , Co, Ni), l'effet inflammatoire a été déterminé *in vitro* sur cultures de macrophages alvéolaires de rat et *in vivo*, par instillation intratrachéale chez le rat. Les effets ont été reliés à l'évaluation des cassures d'ADN plasmidique (méthode d'évaluation de la génération de radicaux libres ; Dick et coll., 2003). Les résultats ont montré une absence de relation entre l'activité sur l'ADN et les effets biologiques, ce qui n'est pas en faveur d'un rôle direct de radicaux libres dans la réponse inflammatoire.

Toutefois, une relation voisine de la linéarité entre la diminution du pourcentage d'ADN plasmidique super-enroulé et la concentration massique ($\mu\text{g/ml}$) en TiO_2 fin (500 nm) a été rapportée par Donaldson et coll. (1996).

Bien qu'il s'agisse de travaux portant sur le quartz, on peut ici citer l'article de Clouter et coll. (2001) qui n'ont pas observé de relation entre la capacité du quartz à produire des radicaux hydroxyles ($\text{HO}^\bullet$) et l'activité biologique des échantillons testés. Les échantillons consistaient en du quartz naturel et deux échantillons recueillis en milieu du travail, de taille et de surface spécifique voisines. Dans cette étude, la production de $\text{HO}^\bullet$ était déterminée par RPE, et l'activité biologique par le nombre de PMN après instillation intratrachéale chez le rat, la cytotoxicité et sur cellules épithéliales pulmonaires A549 et sur macrophages.

Les données de la littérature montrent que la matière particulaire produit des espèces réactives dérivées de l'oxygène par l'intermédiaire de la présence de métaux de transition, de substances organiques polaires ou aromatiques, voire par d'autres mécanismes plus directement liés à la nature propre de la surface des particules. Il semble que cette production ne soit pas quantitativement dépendante de l'aire ou de la surface spécifique des particules. Là encore, il faut constater que les études ont porté, très majoritairement, sur des évaluations de réponses biologiques en rapport avec l'inflammation, mais que d'autres effets, potentiellement délétères, en particulier cancérogènes, n'ont pas été abordés.

2.4. Commentaires sur les critères d'évaluation des dommages biologiques potentiels utilisés dans les différentes études

Bien qu'un grand nombre d'études ait porté sur les effets biologiques de PUF, il faut souligner que, dans la très grande majorité des études, l'évaluation de dommages potentiels a été effectuée dans le contexte de la réponse inflammatoire pulmonaire et, avec une moindre importance, dans le cadre d'études de la fonction vasculaire. En outre, ces études n'ont appréhendé, le plus souvent, que des effets à court terme. Sachant que, d'une part, des PUF peuvent atteindre différents organes et que, d'autre part, elles sont susceptibles de provoquer des endommagements du matériel génétique et des cancers, chez l'animal, les conclusions que l'on peut tirer de ces travaux seront donc limitées, car les résultats n'ont de signification que dans le cadre du (ou des) mécanisme(s) que les approches expérimentales ont abordés.

En dépit de cette abondante littérature sur les effets des PUF, les données sur les corrélations entre les effets biologiques et différents paramètres (masse, nombre, réactivité de surface, éléments organiques, métalliques ou biologiques adsorbés) susceptibles de quantifier l'exposition sont peu nombreuses, et il n'y a pas de résultats consensuels permettant de faire un choix relatif à un paramètre pertinent unique pour prédire des effets biologiques. Si plusieurs auteurs ont établi ou suggéré une relation entre les effets biologiques et l'aire des particules, cette proposition ne peut être généralisée qu'avec prudence car il existe des données contradictoires. Pour répondre plus certainement à cette problématique, il serait nécessaire de comparer les effets de plusieurs types de PUF à aire équivalente « toutes choses égales par ailleurs ». Hormis l'utilisation de particules « modèles », c'est une mission très difficile en raison de l'hétérogénéité de composition des PUF.

Il faut toutefois noter que, parmi les auteurs qui ont établi une corrélation mathématique entre les effets et l'aire, une relation avec la masse et/ou nombre existe (Maynard et

Maynard, 2002 ; Hamoir et coll., 2003). Dans leur étude sur la réponse cellulaire à des PUF de l'air ambiant, Li et coll. (2003) considèrent que des normes fondées sur le nombre de particules, plutôt que la masse, seraient plus pertinentes ; ils n'excluent pas toutefois que d'autres paramètres pourraient être pris en compte, tels que des métaux susceptibles d'interagir avec des composés organiques.

Les PUF se présentent généralement sous forme d'agrégats. L'état de désagrégation des particules dans les différents milieux biologiques est un paramètre difficile à évaluer, mais il est clair que, selon l'état de désagrégation, pour une masse donnée d'une substance, les dimensions et le nombre de « particules » (sous-entendu agrégats, et non particules individualisées) au contact des cellules et des tissus pourra différer.

La présence d'autres substances adsorbées à la surface des particules fait de cette surface une entité complexe et potentiellement réactive. L'étude des effets de PUF, en particulier du rôle de la surface, est de ce fait indissociable de l'étude du rôle des éléments adsorbés. D'après les données analysées, il y a un consensus pour considérer que les métaux jouent un rôle dans la production d'espèces actives dérivées de l'oxygène, mais avec un potentiel différent selon l'élément, le fer ne semblant pas, dans l'ensemble, plus réactif que d'autres métaux tels que Cu ou Zn. Les molécules organiques semblent aussi jouer un rôle dans ce contexte. Cependant, les activités oxydantes ne représentent qu'un aspect de l'activité potentielle de ces substances et les activités en relation avec les effets mutagènes et génotoxiques mériteraient d'être mieux documentées. Il est intéressant de signaler ici que Somers et coll. (2002) ont montré que la pollution atmosphérique produisait des mutations chez des souris exposées à des particules de régions polluées, et que ces mutations étaient héritées par les générations suivantes. En outre, des anomalies chromosomiques (micronoyaux) ont été observées par Rahman et coll. (2002) sur des cellules embryonnaires de hamster exposées à TiO_2 ultra-fin. D'autres exemples existent : *in vivo*, après instillation intratrachéale de particules diesels chez le rat, Iwai et coll. (2000) ont observé la formation de 8-OHdG dans les cellules pulmonaires, et différents auteurs ont observé une altération de l'ADN génomique cellulaire (Shi et coll., 2003 ; Schins et coll. 2002 ; pour ces derniers, il s'agit de quartz). Cela témoigne de l'utilité d'aborder les effets génotoxiques potentiels de ces particules ultra-fines.

Autre élément important de la définition de la nature de la surface des particules, les endotoxines jouent indiscutablement un rôle important dans la réponse pro-inflammatoire. La connaissance de la contamination en endotoxines est un élément indispensable pour conclure à des effets, en fonction de paramètres physicochimiques des particules.

La production d'espèces actives dérivées de l'oxygène (EAO), en particulier les radicaux libres, est une conséquence de la réactivité des surfaces des particules ; elle est liée à la nature de la surface plutôt qu'à sa dimension. Il n'est en effet généralement pas observé de relation entre la production de ces espèces et l'aire ou la surface spécifiques des particules. Cela reflète probablement la complexité de la nature de la surface, où

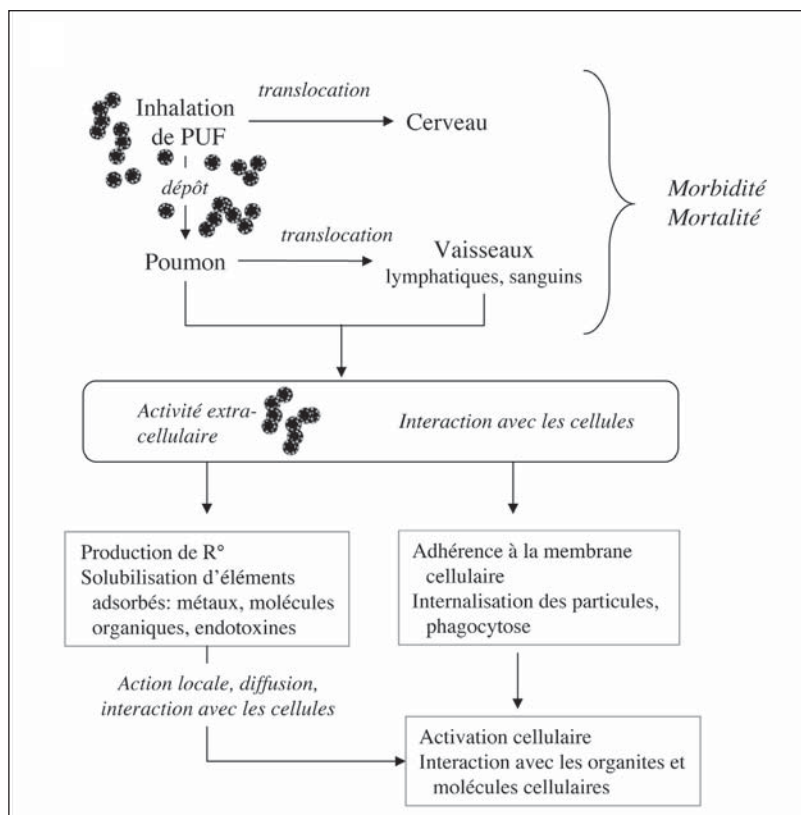


Figure 7.9. Plusieurs étapes sont à considérer pour rendre compte des effets des PUF. Après inhalation, les particules cheminent dans les voies aériennes et sont susceptibles d'être déposées dans les fosses nasales, le nasopharynx et le poumon. Une fraction des particules déposées peut passer dans le cerveau et dans les vaisseaux, lymphatiques ou sanguins, ainsi que dans d'autres organes. C'est l'ensemble de ces processus, plus particulièrement semble-t-il la translocation dans la circulation, qui génère morbidité et mortalité lors de pics de pollution.

Les études réalisées jusqu'ici portent majoritairement sur la réponse pro-inflammatoire pulmonaire, alors que peu de données sont disponibles sur les atteintes d'autres organes. Dans le poumon, les particules peuvent avoir une activité extracellulaire, soit directement (production de radicaux libres), soit par l'intermédiaire de la solubilisation d'éléments adsorbés. Ces différents agents, ou leurs dérivés, peuvent aussi diffuser et interagir avec les cellules. Les particules solides adhèrent à la membrane cellulaire et sont parfois internalisées. L'internalisation peut entraîner une altération de la fonction phagocytaire des macrophages, avec pour conséquence leur endommagement et un défaut d'épuration des particules ultérieurement inhalées. Dans le cas des cellules épithéliales pulmonaires, la phagocytose peut conduire à une altération des structures et des macromolécules cellulaires, y compris l'ADN et les chromosomes.

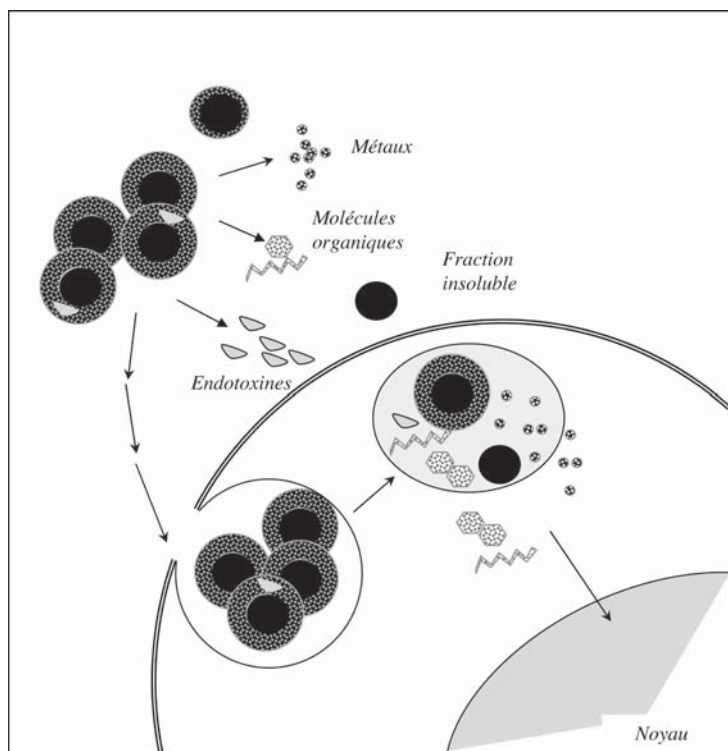


Figure 7.10. D'après les données de la littérature, les PUF peuvent avoir différents niveaux de complexité, selon la teneur en éléments adsorbés (métaux, molécules organiques, endotoxines) et selon la fraction insoluble. Ces particules se présentent souvent sous forme d'agrégats et la réponse cellulaire est susceptible d'être modulée selon la taille et le degré de cohésion des agrégats. L'interaction entre les particules natives ou ayant subi une solubilisation partielle des éléments adsorbés, suivie de phagocytose, conduit à une oxydation intracellulaire et à une activation de voies de signalisation. Les études ayant montré des endommagements du matériel génétique suggèrent une activité lors de certaines étapes de la division cellulaire. La fraction solide et les éléments susceptibles d'être solubilisés dans les cellules indiquent que l'activité des PUF peut être multifactorielle.

différents éléments peuvent aussi bien potentialiser la production qu'interagir négativement. Il faut aussi considérer que, dans le cadre de la génération d'EAO, celles qui relèvent d'un processus physicochimique de surface ne représentent qu'une partie des espèces formées, puisque les cellules sont elles-mêmes capables d'en produire. Cela peut expliquer pourquoi il n'y a pas de lien évident entre la production de ces espèces, dans un milieu acellulaire, et la réponse des cellules (figure 7.9). Là encore cependant, une tendance est suggérée pour que les particules les plus actives *in vitro*, dans un système acellulaire, soient aussi les plus actives sur les cellules, mais aucune relation quantitative n'a été établie. D'autres paramètres, tels que la quantité de particules

phagocytées par les cellules et leur toxicité propre sont des facteurs très importants qui conditionnent la réponse cellulaire (figure 7.10)

Finalement, à la lecture des données actuelles de la littérature, il apparaît que les résultats ne sont disponibles que dans un domaine limité du champ d'action possible des PUF. Vouloir faire dépendre les effets d'un unique paramètre physicochimique des particules serait réducteur. Parallèlement, vouloir généraliser les conclusions obtenues avec des PUF de l'air ambiant à des PUF fabriquées par des nanotechnologies mérite réflexion. S'il y a des évidences expérimentales pour considérer, en regard de la toxicité pulmonaire, qu'un matériau de dimension nanométrique est plus actif (en termes de masse) que ce même matériau sous forme micrométrique, la comparaison intermatériaux nécessite la prise en compte de la nature des particules. Les propositions actuelles ne peuvent être que des solutions d'attente, avant l'obtention de résultats plus convaincants. Les mécanismes d'action de ces PUF, dans les domaines abordés, essentiellement réponse pro-inflammatoire à court terme, éléments de modification de la fonction vasculaire et génotoxicité, font apparaître que la réponse dépend de plusieurs paramètres qui incluent la quantité de particules et la nature de la surface. Les études de corrélation entre dose de particules et effets feront donc appel à des analyses multifactorielles.

Bibliographie

- Adamson IY, Prieditis H, Hedgecock C, Vincent R (2000). Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. *Toxicol Appl Pharmacol* **166**, 111-119.
- Alberg AJ, Brock MV, Samet JM (2005). Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol* **23**, 3175-3185.
- Bagate K, Meiring JJ, Gerlofs-Nijland ME, Vincent R, Cassee FR, Borm PJ (2004). Vascular effects of ambient particulate matter instillation in spontaneous hypertensive rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **197**, 29-39.
- Bailey RC, Nam JM, Mirkin CA, Hupp JT (2003). Real-time multicolor DNA detection with chemoresponsive diffraction gratings and nanoparticle probes. *J Am Chem Soc* **125**, 13541-13547.
- Barlow PG, Donaldson K, MacCallum J, Clouter A, Stone V (2005). Serum exposed to nanoparticle carbon black displays increased potential to induce macrophage migration. *Toxicol Lett* **155**, 397-401.
- Beck-Speier I, Dayal N, Karg E, Maier KL, Roth C, Ziesenis A, Heyder J (2001). Agglomerates of ultrafine particles of elemental carbon and TiO₂ induce generation of lipid mediators in alveolar macrophages. *Environ Health Perspect* **109** (Suppl 4), 613-618.
- Borm PJ, Kreyling W (2004). Toxicological hazards of inhaled nanoparticles--potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol* **4**, 521-531.
- Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA, Stone V (2004). Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine

- gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L344-L353.
- Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K (2000). Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med* **57**, 685-691.
- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Applied Pharmacol* **175**, 191-199.
- Calderon-Garciduenas L, Azzarelli B, Acuna H, Garcia R, Gambling TM, Osnaya N, Monroy S, Del Tizapantzi MR, Carson JL, Villarreal-Calderon A, Rewcastle B (2002). Air pollution and brain damage. *Toxicol Pathol* **30**, 373-389.
- Campbell A, Oldham M, Becaria M, Bondy SC, Meacher D, Sioutas C, Misra C, Mendez LB, Kleinman M (2005). Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *NeuroToxicol* **26**, 133-140.
- Chen Y, Xue Z, Zheng D, Xia K, Zhao Y, Liu T, Long Z, Xia J (2003). Sodium chloride modified silica nanoparticles as a non-viral vector with a high efficiency of DNA transfer into cells. *Curr Gene Ther* **3**, 273-279.
- Clouter A, Brown D, Höhr D, Borm P, Donaldson K (2001). Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus standard DQ12 quartz: particle surface correlates. *Toxicol Sci* **63**, 90-98.
- Cognet L, Tardin C, Boyer D, Choquet D, Tamarat P, Lounis B (2003). Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11350-11355.
- Dai J, Xie C, Churg A (2002). Iron Loading Makes a Nonfibrogenic Model Air Pollutant Particle Fibrogenic In Rat Tracheal Explants. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 685-693.
- Dai J, Xie C, Vincent R, Churg A (2003). Air pollution particles produce airway wall remodeling in rat tracheal explants. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**, 352-358.
- Dasenbrock C, Peters L, Creutzenberg O, Heinrich U (1996). The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. *Toxicol Lett* **88**, 15-21.
- DeMarini DM, Brooks LR, Warren SH, Kobayashi T, Gilmour MI, Singh P (2004). Bioassay-directed fractionation and salmonella mutagenicity of automobile and forklift diesel exhaust particles. *Environ Health Perspect* **112**, 814-819.
- Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* **15**, 39-52.
- Donaldson K, Beswick PH, Gilmour PS (1996). Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol Lett* **88**, 293-298.
- Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V (2002). The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* **15**, 213-220.
- Dorman DC, Brenneman KA, McElveen AM, Lynch SE, Roberts KC, Wong BA (2002). Olfactory transport: a direct route of delivery of inhaled manganese phosphate to the rat brain. *J Toxicol Environ Health A* **65**, 1493-1511.
- Driscoll KE (1996). Role of inflammation in the development of rat lung tumors in response to chronic particle exposure. *Inhal Toxicol* **8 (Suppl.)**, 139-153.

- Duffin R, Gilmour PS, Schins RP, Clouter A, Guy K, Brown DM, MacNee W, Borm PJ, Donaldson K, Stone V (2001). Aluminium lactate treatment of DQ12 quartz inhibits its ability to cause inflammation, chemokine expression, and nuclear factor-kappaB activation. *Toxicol Appl Pharmacol* **176**, 10-17.
- Ernst H, Rittinghausen S, Bartsch W, Creutzenberg O, Dasenbrock C, Gorlitz BD, Hecht M, Kairies U, Muhle H, Muller M, Heinrich U, Pott F (2002). Pulmonary inflammation in rats after intratracheal instillation of quartz, amorphous SiO₂, carbon black, and coal dust and the influence of poly-2-vinylpyridine-N-oxide (PVNO). *Exp Toxicol Pathol* **54**(2) 109-126.
- Gallagher J, Sams R, 2nd, Inmon J, Gelein R, Elder A, Oberdörster G, Prahalad AK (2003). Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in rat lung DNA following subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* **190**, 224-231.
- Ghio AJ, Devlin RB (2001). Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 704-708.
- Graff DW, Cascio WE, Brackhan JA, Devlin R (2004). Metal particulate matter components affect gene expression and beat frequency of neonatal rat ventricular myocytes. *Environ Health Perspect* **112**, 792-798.
- Hamoir J, Nemmar A, Halloy D, Wirth D, Vincke G, Vanderplasschen A, Nemery B, Gustin P (2003). Effect of polystyrene particles on lung microvascular permeability in isolated perfused rabbit lungs: role of size and surface properties. *Toxicol Appl Pharmacol* **190**, 278-285.
- Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K (1995). Chronic Inhalation Exposure of Wistar Rats and Two Different Strains of Mice to Diesel Engine Exhaust, Carbon Black, and Titanium Dioxide. *Inhal Toxicol* **7**(4) 533-556.
- Hetland RB, Myhre O, Lag M, Hongve D, Schwarze PE, Refsnes M (2001a). Importance of soluble metals and reactive oxygen species for cytokine release induced by mineral particles. *Toxicology* **165**, 133-144.
- Hetland RB, Schwarze PE, Johansen BV, Myran T, Uthus N, Refsnes M (2001b). Silica-induced cytokine release from A549 cells: importance of surface area versus size. *Hum Exp Toxicol* **20**, 46-55.
- Hetland RB, Refsnes M, Myran T, Johansen BV, Uthus N, Schwarze PE (2000). Mineral and/or metal content as critical determinants of particle-induced release of IL-6 and IL-8 from A549 cells. *J Toxicol Environ Health A* **60**, 47-65.
- Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13549-13554.
- Höhr D, Steinfartz Y, Schins RP, Knaapen AM, Martra G, Fubini B, Borm PJ (2002). The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *Int J Hyg Environ Health* **205**, 239-244.
- Huang SL, Cheng WL, Lee CT, Huang HC, Chan CC (2002). Contribution of endotoxin in macrophage cytokine response to ambient particles *in vitro*. *J Toxicol Environ Health A* **65**(17) 1261-1272.
- Huang YC, Ghio AJ, Stonehuerner J, McGee J, Carter JD, Grambow SC, Devlin RB (2003). The role of soluble components in ambient fine particles-induced changes in human lungs and blood. *Inhal Toxicol* **15**, 327-342.
- Imrich A, Ning Y, Kobzik L (2000). Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* **167**(2) 140-150.

- Iwai K, Adachi S, Takahashi M, Moller L, Udagawa T, Mizuno S, Sugawara I (2000). Early oxidative DNA damages and late development of lung cancer in diesel exhaust-exposed rats. *Environ Res* **84**, 255-264.
- Kim H, Liu X, Kobayashi T, Kohyama T, Wen FQ, Romberger DJ, Conner H, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W, Rennard SI (2003). Ultrafine carbon black particles inhibit human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 111-121.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* **111**, 455-460.
- Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM, Nel AE (2002). Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol* **169**, 4531-4541.
- Li XY, Brown D, Smith S, MacNee W, Donaldson K (1999). Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* **11**, 709-731.
- Lison D, Lardot C, Huaux F, Zanetti G, Fubini B (1997). Influence of particle surface area on the toxicity of insoluble manganese dioxide dusts. *Arch Toxicol* **71**(12) 725-729.
- MacNee W, Donaldson K (2003). Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur Respir J (Suppl. 40)*, 47s-51s.
- Maynard AD, Maynard RL (2002). A derived association between ambient aerosol surface area and excess mortality using historic time series data. *Atmospheric Environ* **36**, 5561-5567.
- Mazzola L (2003). Commercializing nanotechnology. *Nat Biotechnol* **21**, 1137-1143.
- McNeilly JD, Heal MR, Beverland IJ, Howe A, Gibson MD, Hibbs LR, MacNee W, Donaldson K (2004). Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* **196**, 95-107.
- McNeilly JD, Jimenez LA, Clay MF, MacNee W, Howe A, Heal MR, Beverland IJ, Donaldson K (2005). Soluble transition metals in welding fumes cause inflammation via activation of NF-kappaB and AP-1. *Toxicol Lett* **158**, 152-157.
- Molinelli AR, Madden MC, McGee JK, Stonehuerner JG, Ghio AJ (2002). Effect of metal removal on the toxicity of airborne particulate matter from the Utah Valley. *Inhalat Toxicol* **14**, 1069-1086.
- Möller W, Hofer T, Ziesenis A, Karg E, Heyder J (2002). Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicol Applied Pharmacol* **182**, 197-207.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**, 411-414.
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Nemery B (2004). Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett* **149**, 243-253.
- Oberdörster G (1996). Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhal Toxicol* **8 (Suppl.)** 73-89.
- Oberdörster G (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* **74**, 1-8.

- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* **65**, 1531-1543.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004). Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhal Toxicol* **16**, 437-445.
- Ogawara K, Furumoto K, Takakura Y, Hashida M, Higaki K, Kimura T (2001). Surface hydrophobicity of particles is not necessarily the most important determinant in their *in vivo* disposition after intravenous administration in rats. *J Colloid Release* **77**, 191-198.
- Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E, Martinez L, Garcia-Cuellar C, Ponce-de-Leon Rosales S, Miranda J, Rosas I (2003). Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter *in vitro* are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect* **111**, 1289-1293.
- Paull R, Wolfe J, Hebert P, Sinkula M (2003). Investing in nanotechnology. *Nat Biotechnol* **21**, 1144-1147.
- Pekkanen J, Peters A, Hoek G, Tiittanen P, Brunekreef B, de Hartog J, Heinrich J, Ibaldo-Mulli A, Kreyling WG, Lanki T, Timonen KL, Vanninen E (2002). Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease: the Exposure and Risk Assessment for Fine and Ultrafine Particles in Ambient Air (ULTRA) study. *Circulation* **106**, 933-938.
- Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA (2001). Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* **103**, 2810-2815.
- Prieditis H, Adamson IY (2002). Comparative pulmonary toxicity of various soluble metals found in urban particulate dusts. *Exp Lung Res* **28**, 563-576.
- Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss DG, Schiffmann D (2002). Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect* **110**, 797-800.
- Rehn B, Seiler F, Rehn S, Bruch J, Maier M (2003). Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol Appl Pharmacol* **189**, 84-95.
- Riley MR, Boesewetter DE, Kim AM, Sirvent FP (2003). Effects of metals Cu, Fe, Ni, V, and Zn on rat lung epithelial cells. *Toxicology* **190**, 171-184.
- Schins RP (2002). Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhal Toxicol* **14**, 57-78.
- Schins RP, Duffin R, Höhr D, Knaapen AM, Shi T, Weishaupt C, Stone V, Donaldson K, Borm PJ (2002). Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol* **15**, 1166-1173.
- Schins RP, Lightbody JH, Borm PJ, Shi T, Donaldson K, Stone V (2004). Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**(1) 1-11.
- Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G, Kreyling WG (2004). Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol* **16**, 453-459.
- Shi T, Knaapen AM, Begerow J, Birmili W, Borm PJ, Schins RP (2003). Temporal variation of hydroxyl radical generation and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation by coarse and fine particulate matter. *Occup Environ Med* **60**, 315-321.

- Somers CM, Yauk CL, White PA, Parfett CL, Quinn JS (2002). Air pollution induces heritable DNA mutations. *PNAS* **99**, 15904-15907.
- Sorensen M, Autrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, Knudsen LE, Loft S (2003). Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res* **544**, 255-271.
- Soukup JM, Becker S (2001). Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol* **171**, 20-26.
- Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ (2001). Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Physiol* **24**, 108-115.
- Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Schulz H, Ziesenis A, Schramel P, Heyder J (2004). Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* **16 (Suppl. 1)**, 83-92.
- Uchino T, Tokunaga H, Ando M, Utsumi H (2002). Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO₂-UVA treatment. *Toxicol In Vitro* **16**, 629-635.
- Warheit DB, Reed KL, Webb TR (2003). Pulmonary toxicity studies in rats with triethoxyoctylsilane (OTES)-coated, pigment-grade titanium dioxide particles: bridging studies to predict inhalation hazard. *Exp Lung Res* **29**, 593-606.
- Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V (2002). Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* **184** 172-179.
- Zhou YM, Zhong CY, Kennedy IM, Pinkerton KE (2003). Pulmonary responses of acute exposure to ultrafine iron particles in healthy adults rats. *Environ Toxicol* **18**, 227-235.

Discussion (2). Paramètres chimiques de la toxicité des particules ultra-fines

8

1. Rôle des substances adsorbées

G. Lacroix

Introduction générale sur les propriétés physicochimiques des particules

Des liens entre pollution atmosphérique particulaire et effets sanitaires ont été établis de longue date. Cependant, les causes exactes à l'origine des effets observés ne sont pas encore clairement définies. La masse des particules, leur taille, leur nombre, leurs propriétés de surface, leur composition chimique... peuvent jouer un rôle mais on ne sait pas encore bien dans quelle mesure, ni si des interactions entre ces paramètres existent (Reynolds et Richards, 2001).

De nombreux travaux sont en cours pour comprendre quelles propriétés des particules sont à l'origine d'effets délétères. Ils portent sur différents types de particules, essentiellement fines ou ultra-fines (PUF) et en tout cas inhalables (particules atmosphériques, particules diesels [PED], résidus de combustion riches en métaux...).

Parmi les propriétés physicochimiques des particules pouvant moduler leurs effets toxiques, la taille (et ses paramètres corrélés que sont le volume, la surface et le nombre) semble jouer un rôle prépondérant. Diverses études utilisant des particules insolubles telles que le dioxyde de titane (TiO_2), le noir de carbone ou le cobalt, ont montré que, pour une exposition à une masse donnée de particules, les particules

ultra-fines (14-21 nm) induisaient des lésions pulmonaires plus sévères et persistantes que les particules fines (250-320 nm ; Li et coll., 1999 ; Oberdörster et coll., 1994 ; Osier et Oberdörster, 1997 ; Zhang et coll., 2000).

Ceci s'expliquerait par une surface spécifique plus grande chez les particules les plus fines (Salvi et Holgate, 1999). Ainsi, des effets toxiques plus importants ont été observés pour des particules de surface élevée, comparativement à des particules de composition similaire mais présentant une surface plus petite (Brown et coll., 2001 ; Hohr et coll., 2002 ; Lison et coll., 1997). Plus les particules sont de faible taille, plus leur surface spécifique, pour une masse donnée, augmente et donc également leur capacité à transporter des substances toxiques et des radicaux libres (Salvi et Holgate, 1999). Ainsi, un nombre plus important de radicaux libres a été détecté dans des échantillons de PUF, comparativement à des échantillons plus grossiers de ces mêmes poussières (Donaldson et coll., 1998 ; Zhang et coll., 1998).

D'autres facteurs que la surface spécifique peuvent contribuer à cet état de fait. Par exemple, l'activité radicalaire du TiO_2 ultra-fin (environ 20 nm) était plus importante que celle du TiO_2 commercial (environ 250 nm), mais les auteurs de l'étude n'ont pas pu expliquer cette différence sur la base des surfaces relatives (Gilmour et coll., 1997). Selon un rapport du Concawe (Hext et coll., 1999), cela n'est guère surprenant, car le TiO_2 commercial est souvent traité en surface avec des matériaux type silicone alors que le TiO_2 ultra-fin utilisé par la plupart des expérimentateurs est le « Degussa P_{25} », un matériau ultra-fin doué d'une activité catalytique oxydante de surface très élevée.

Ces résultats indiquent que les propriétés de surface des particules insolubles modulent leur activité biologique. En particulier, leur capacité à induire une inflammation pulmonaire peut s'expliquer par leur activité radicalaire. Le stress cellulaire oxydant qui en résulte peut altérer la phagocytose des macrophages, augmentant de ce fait les interactions entre épithélium et particules ultra-fines. Cela conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et à un transfert de particules dans l'interstitium pulmonaire (Donaldson et coll., 2001). Il convient de noter que les PUF sont agrégées dans la plupart des expérimentations (Hext et coll., 1999). La capacité des particules à traverser la barrière épithéliale et à causer une inflammation, une fois déposées dans l'appareil respiratoire, est liée à leur capacité à se désagréger en particules primaires. Cela peut expliquer, au moins en partie, les différences de translocation pulmonaire des PUF de noir de carbone et de TiO_2 (Hext et coll., 1999).

L'importance potentielle du nombre de particules dans l'expression de leur toxicité n'a été que récemment reconnue. Dans une étude allemande (Peters et coll., 1997), les concentrations en nombre et en masse des particules comprises entre 0,01 et 2,5 μm ont été déterminées durant la saison hivernale. La plupart des particules (73 %) étaient ultra-fines (< 0,1 μm) tandis que l'essentiel de la masse était attribuable aux particules de taille comprise entre 0,1 et 0,5 μm . Des effets respiratoires, chez un groupe de patients

asthmatiques, ont été associés au nombre de PUF. Des résultats similaires ont été notés dans une étude finnoise (Penttinen et coll., 2001). Cependant, aucune association n'a été trouvée, chez des patients souffrant d'obstruction pulmonaire chronique, entre leurs symptômes, le débit expiratoire de pointe (DEP) et le nombre de PUF (Osunsanya et coll., 2001).

Le rôle de différents paramètres physiques dans la toxicité des particules a été étudié lors d'une série d'expériences au cours desquelles la masse totale, la taille, le nombre ou la surface spécifique des particules étaient déterminés, grâce à l'utilisation de billes de polystyrène (PSP) sphériques et bien caractérisées (Granum et coll., 2000). Des souris ont reçu deux injections intrapéritonéales d'ovalbumine avec différentes doses de PSP. Les taux d'IgE spécifiques sériques ont augmenté avec le nombre et la surface des particules, alors qu'aucun lien n'était relevé avec la masse totale ou la taille. Selon les auteurs de l'étude, l'étendue des tailles était insuffisante pour mettre en évidence une éventuelle relation. Cette étude montre que le nombre et la surface des billes de polystyrène, mais non leur masse, sont des paramètres importants pour l'activité adjuvante de ces particules.

Les résultats de toutes ces études montrent qu'il peut y avoir un nombre important de petites particules ne contribuant que faiblement à la masse totale mais qui peuvent avoir des effets biologiques importants.

La composition chimique des particules joue également certainement un rôle non négligeable dans la modulation de la toxicité observée. Certaines particules environnementales, comme les particules diesels (PED), recèlent plusieurs milliers de composés organiques de haut poids moléculaire (Salvi et Holgate, 1999). On ne sait pas encore clairement quel composant de la particule diesel produit une toxicité. Certaines études suggèrent que la majorité de la toxicité est attribuable aux composés organiques adsorbés (Boland et coll., 1999 ; Ohtoshi et coll., 1998 ; Sagai et coll., 1993 ; Yang et coll., 1999), tandis que d'autres concluent que la partie la plus dangereuse des PED est le corps carboné (Lovik et coll., 1997 ; Samet et coll., 2000). Plus vraisemblablement, comme nous le verrons par la suite, il doit y avoir une combinaison de ces deux facteurs (voir Xia et coll., 2004). Si les PED ont toujours constitué un matériau de choix pour l'étude de la toxicité des composés organiques adsorbés (HAP notamment ; voir partie 2, ci-après), d'autres types de poussières, comme les résidus de combustion, ont été utilisés pour l'étude du rôle des composants inorganiques, en raison de leur richesse en métaux notamment.

1.1. Rôle des constituants chimiques adsorbés dans la toxicité des particules

1.1.1. Effets des particules *per se*

Plusieurs études, utilisant différents modèles de particules comme le polystyrène, le noir de carbone, la silice amorphe, le téflon ou le dioxyde de titane, montrent que les

particules *per se* peuvent exercer des effets toxiques indépendamment des substances chimiques adsorbées que l'on trouve sur les particules environnementales (revue par Granum, 2002).

1.1.2. Effets des composés associés aux particules

Il serait tentant de rechercher et d'identifier un composé particulier présent sur les particules, qui serait responsable à lui seul de leurs effets nocifs. Il est peu probable que cela arrive un jour. Le Comité sur les effets médicaux de la pollution atmosphérique du département Santé anglais a conclu en 1995 qu'aucune substance chimique connue ne présentait de toxicité suffisante, eu égard aux niveaux actuels d'exposition aux particules environnementales, permettant d'expliquer l'ordre de grandeur des effets observés (Harrison et Yin, 2000). Les études épidémiologiques s'intéressant au lien entre mortalité et concentrations atmosphériques en PM_{10} montrent avec une remarquable constance, quel que soit le lieu où elles sont réalisées, que la chimie des particules n'a que peu d'importance dans leur toxicité (Harrison et Yin, 2000). D'un autre côté, il semble difficile d'imaginer que la composition chimique des particules soit totalement neutre (Harrison et Yin, 2000) et les données expérimentales allant dans ce sens sont présentées ci-après.

| Composés inorganiques

Les constituants inorganiques des particules environnementales tels que les sulfates, nitrates, ammonium et métaux peuvent être cause d'effets délétères sur la santé (Dreher, 2000). Les composés principaux que sont les sulfates, les nitrates, les chlorures ou l'ammonium ne semblent pas moduler fortement la toxicité (Harrison et Yin, 2000) ; néanmoins, l'exposition aiguë de souris à du noir de carbone recouvert de sulfate a induit une altération de la phagocytose des macrophages et de l'activité bactéricide intrapulmonaire (Clarke et coll., 2000 ; Jakab et coll., 1996).

On sait depuis longtemps que certains métaux traces comme le plomb, le cadmium ou le mercure sont fortement toxiques, mais l'exposition à ces substances *via* l'inhalation de particules environnementales dans les pays développés est sans doute insuffisante pour induire des effets toxiques selon des mécanismes classiques de toxicité (Harrison et Yin, 2000).

Certains travaux suggèrent que les métaux de transition, et notamment le fer, peuvent induire des effets toxiques par des mécanismes particuliers, par exemple contribuer à la production de radicaux oxhydriles *via* la réaction de Fenton (Donaldson et MacNee, 2001 ; Gilmour et coll., 1996 ; Wilson et coll., 2002). De nombreuses études ont été menées sur les ROFA (*Residual Oil Fly Ashes*), particules issues de résidus de

combustion, pauvres en composés organiques mais riches en métaux, dont le fer, le vanadium et le nickel. Ces travaux ont montré que les métaux de transition solubles, notamment le vanadium, induisaient des lésions pulmonaires chez l'homme et l'animal (Ghio et coll., 2002).

La toxicité potentielle de divers métaux présents dans les poussières urbaines a été étudiée chez la souris (Prieditis et Adamson, 2002). Des solutions de sels métalliques (Zn, Cu, V, Ni, Fe, Pb) ont été instillées dans les poumons de souris à des concentrations similaires aux teneurs en zinc des particules EHC-93 (soit 4,8 µg/mg dans 0,1 ml). Il a été montré que le Zn et, dans une moindre mesure le Cu, induisaient des lésions pulmonaires d'intensité similaire à celle observée après instillation de 1 mg de poussière sous un volume de 0,1 ml. Pour cette poussière particulière, les résultats indiquent que le Zn et le Cu sont susceptibles d'être à l'origine d'une inflammation pulmonaire, ce qui n'a pas été mis en évidence avec les autres métaux étudiés aux mêmes concentrations (Ni, Fe, Pb et V).

Plusieurs études toxicologiques *in vitro* ont également montré que la déféroxamine, un chélateur de métaux, inhibait un certain nombre de réponses biologiques induites par les ROFA ou les particules urbaines, ce qui renforce l'hypothèse du rôle des métaux associés aux particules dans la toxicité de ces dernières (revue par Dreher, 2000 ; voir le point 3). Il faut cependant noter que les preuves épidémiologiques d'une relation entre métaux de transition à des concentrations environnementales et effets sur la santé sont absentes (Brunekreef, 2000).

Pour les particules de nature carbonée (comme les PED), les teneurs en métaux peuvent être extrêmement basses. Toutefois, il a été montré que l'exposition de rats à des PED à faibles teneurs en métaux provoquait une accumulation de fer biologiquement actif dans les poumons des animaux, se traduisant par un stress oxydant et des lésions pulmonaires (Ghio et coll., 2000).

Pour terminer, il faut souligner que des éléments métalliques à l'état de traces tels que le platine, le rhodium ou le palladium ont été détectés sur des PED. Ces métaux proviendraient de l'usure du moteur, de l'huile et des systèmes de catalyse. En raison de leur appartenance à la famille des métaux de transition, ces éléments doivent retenir l'attention des toxicologues. Quelques données existent, sur la toxicité des sels de platine surtout. Des travaux supplémentaires sont donc nécessaires pour étudier la valence et la solubilité de ces composés lorsqu'ils sont adsorbés sur les particules, et pour préciser leur rôle potentiel dans leur toxicité. En raison de son rôle dans les effets délétères des ROFA, le vanadium est également à surveiller (et notamment le pentoxyde de vanadium largement utilisé comme catalyseur dans de nombreux domaines) ; une étude a montré que ce composé était un cancérogène pulmonaire chez le rat et la souris (Ress et coll., 2003).

| Composés organiques

L'essentiel des informations dont on dispose sur le rôle potentiel des constituants organiques (et notamment les HAP) dans la toxicité associée aux particules provient d'études sur les PED.

Les HAP extraits des PED et divers HAP (pyrène, phénanthrène) souvent adsorbés sur ces particules ont de nombreux effets sur la réponse allergique, en particulier sur la production d'IL-4 (Bommel et coll., 2000), d'IgE (Suzuki et coll., 1993 ; Takenaka et coll., 1995 ; Tsien et coll., 1997) et sur l'induction de réponses inflammatoires (Fahy et coll., 1999 ; Terada et coll., 1997).

Ces résultats doivent être nuancés. En effet, la biodisponibilité des composés doit être prise en considération pour estimer de façon réaliste la quantité potentielle délivrée après inhalation de PED. Lorsque l'on travaille sur des extraits organiques, on force la désorption des composés chimiques du corps de la particule, les rendant fortement biodisponibles. De plus, considérant les effets cancérogènes, les composés chimiques adsorbés sur les particules pourraient ne pas être aussi mutagènes *in vivo* qu'ils le sont dans la plupart des tests *in vitro*, car les substances extraites par des fluides physiologiques tels qu'une solution saline ou du sérum sont généralement moins génotoxiques que lorsqu'elles sont extraites par des solvants organiques employés couramment *in vitro* (Cohen et Nikula, 1999).

De nombreux autres facteurs affectent la biodisponibilité des constituants organiques présents sur les particules. Le degré d'agglomération des particules module la libération des composés organiques. Il pourrait y avoir une plus forte agglomération des particules dans les études d'instillation intratrachéale où les concentrations d'exposition sont élevées par rapport à ce qui se passe dans l'environnement (Cohen et Nikula, 1999). Ceci pourrait expliquer les résultats contradictoires observés entre les études par instillation et par inhalation (Osier et Oberdörster, 1997). Des adduits à l'ADN ont été observés chez des rats exposés par inhalation soit à des PED (comportant 30 % de composés organiques) soit à du noir de carbone (teneur en composés organiques 0,04 %), suggérant un rôle prépondérant du noyau carboné de la particule (Bond et coll., 1990) ; un résultat similaire a été obtenu par Gallagher et coll., (1994). À l'inverse, des études par inhalation ont montré que des PED sans composés chimiques organiques adsorbés induisaient moins de tumeurs que les PED natives (Dasenbrock et coll., 1996 ; Iwai et coll., 1997), ce qui plaide en faveur d'un rôle important des composés adsorbés.

1.2. Rôle du corps de la particule *versus* les composés chimiques adsorbés

Les effets imputables aux particules environnementales sont probablement liés à la fois au corps de la particule et aux substances chimiques adsorbées (Granum et Lovik, 2002).

L'exposition intratrachéale de rats à des PED induit une inflammation et des lésions pulmonaires similaires à celles produites par le noir de carbone ou la silice (Yang et coll., 1999). Mais seules les PED ont supprimé la libération de cytokines par les macrophages alvéolaires en réponse à une stimulation par le lipopolysaccharide (une endotoxine bactérienne). Cette réponse cellulaire contrastée, selon qu'il s'agit de PED ou de noir de carbone, pourrait s'expliquer par la présence de composés organiques adsorbés, qui contribueraient ainsi à une sensibilité plus grande des individus aux infections pulmonaires après exposition aux PED.

Les particules pourraient également transporter les substances adsorbées vers des régions des poumons où elles n'ont normalement pas accès, induisant des effets généralement non associés au corps de la particule (Hext et coll., 1999). Des particules de noir de carbone ont été co-générées avec 10 ppm de SO_2 pour évaluer leur capacité à former du H_2SO_4 et par là-même se comporter comme un transporteur de ce dernier au niveau pulmonaire (Hemenway et coll., 1996). À une humidité relative allant jusqu'à 60 %, $4 \mu\text{g SO}_4^{2-} / \text{mg}$ de noir de carbone ont été formés, tandis que pour 85 % d'humidité relative, on atteignait $13,7 \mu\text{g SO}_4^{2-}$ par mg de noir de carbone. L'altération de la phagocytose des macrophages alvéolaires n'était significative qu'à 85 % d'humidité. Les auteurs en ont conclu que les particules fines de carbone pouvaient se comporter, dans certaines conditions, comme des vecteurs de quantités toxiques d'ions sulfate. Des particules de noir de carbone ont également été administrées à des souris, conjointement à des vapeurs d'acroléine, composé normalement absorbé au niveau des voies aériennes supérieures (Jakab et Hemenway, 1993). L'exposition durant 4 jours (à raison de 4 heures/jour) à 10 mg/m^3 de noir de carbone et 2,5 ppm d'acroléine a induit des effets toxiques sur les fonctions des macrophages alvéolaires (altération de la phagocytose et diminution de la production de $\text{TNF-}\alpha$ en réponse au LPS) dans les régions inférieures du tractus respiratoire, chez les animaux co-exposés uniquement.

Plusieurs études ont été menées pour déterminer si l'activité adjuvante des PED était le fait du corps de la particule ou des substances chimiques adsorbées. Il a été montré que les PED comme le noir de carbone, injectés conjointement avec de l'ovalbumine chez la souris, présentaient une activité adjuvante (augmentation de la synthèse d'IgE spécifique et inflammation des ganglions lymphatiques). Cet effet était cependant légèrement moins marqué avec le noir de carbone (Lovik et coll., 1997). Ces résultats suggèrent que le corps de la particule contribue à l'activité adjuvante des PED.

Une observation similaire a été faite après injection chez la souris d'extraits de PED ou de PED insolubles (ce qui reste après extraction organique) en présence d'ovalbumine (Heo et coll., 2001). Bien que l'extrait organique ait induit une augmentation significative des taux d'IgE spécifiques par rapport aux souris n'ayant reçu que de l'ovalbumine, cet effet adjuvant était moins important que celui induit par le squelette carboné insoluble.

Dans une autre étude, Kanoh et coll. (1996) ont montré que le pyrène, le fluoranthène, l'anthracène, le benzo[a]pyrène et les PED avaient une activité adjuvante sur la production d'IgE quand les souris étaient immunisées par injection intrapéritonéale d'ovalbumine ou d'allergènes de pollen de cèdre du Japon (Kanoh et coll., 1996). Ces résultats suggèrent que les composés chimiques contenus dans la suie diesel peuvent également présenter une activité adjuvante chez la souris.

Ces trois études indiquent donc que l'effet adjuvant des PED est lié pour la plus grande partie au corps de la particule, avec une contribution additionnelle des composés organiques adsorbés.

Conclusion

Les études toxicologiques ont montré que différentes caractéristiques des particules comme la taille ou les constituants métalliques et organiques étaient à l'origine d'effets biologiques chez l'homme et l'animal (Dreher, 2000).

À l'heure actuelle, il reste beaucoup de lacunes dans la compréhension des mécanismes d'action des particules. Nous ne savons pas comment la surface de la particule interagit avec les milieux biologiques, ni quelles sont les molécules impliquées. Il reste à préciser la nature des relations entre la surface de la particule et la cellule et comment cette particule peut interférer avec l'activité et la différenciation cellulaire. Des zones d'ombre restent à éclaircir concernant la composition chimique, la microstructure et la topographie de surface des particules, à la fois intrinsèquement et dans leurs interactions avec les structures vivantes (Ayles, 1998).

À ce stade, il semble que plusieurs propriétés physiques et chimiques des particules soient responsables d'effets nocifs sur la santé. Pour améliorer l'état des connaissances, il convient de dépasser la simple mesure gravimétrique des particules pour évaluer l'exposition des individus, et de connaître également le nombre, la granulométrie, la surface et le potentiel oxydoréducteur des particules étudiées. Si ces données apparaissent de plus en plus au niveau des études toxicologiques, il reste à harmoniser les méthodes de mesure à l'échelle environnementale.

Les différents paramètres mesurés pourront alors refléter divers effets sur la santé (Ayles, 1998).

Bibliographie

- Ayres JG (1998). Particle mass or particle numbers? *Eur Respir Rev* **8**(53), 135-138.
- Boland S, Baeza-Squiba A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chevrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M, Marano F (1999). Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells *in vitro* and alter cytokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **276**(4) L604-613.
- Bommel H, Li-Weber M, Serfling E, Duschl A (2000). The environmental pollutant pyrene induces the production of IL-4. *J Allergy Clin Immunol* **105**(4) 796-802.
- Bond JA, Harkema JR, Henderson RF, Mauderly JL, McClellan RO, Wolff RK (1990). The role of DNA adducts in diesel exhaust-induced pulmonary carcinogenesis. *Prog Clin Biol Res* **340C**, 259-269.
- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultra-fine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultra-fines. *Toxicol Appl Pharmacol* **175**(3) 191-199.
- Brunekreef B. (2000). What properties of particulate matter are responsible for health effects. *Inhal Toxicol* **12** (Suppl. 1) 15-18.
- Bunn WBI, Valberg PA, Slavin TJ, Lapin CA (2002). What is new in diesel? *Int Arch Occup Environ Health* **75**, S122-S132.
- Clarke RW, Antonini JM, Hemenway DR, Frank R, Kleeberger SR, Jakab GJ (2000). Inhaled particle-bound sulfate: effects on pulmonary inflammatory responses and alveolar macrophage function. *Inhal Toxicol* **12**(3) 169-186.
- Cohen AJ, Nikula K (1999). The health effects of diesel exhaust: laboratory and epidemiologic studies. In: *Air pollution and health* (S. T. Holgate, Samet, J.M, Koren, H.S, Maynard, R.L, eds.), pp. 707-745. Academic Press, London.
- Dasenbrock C, Peters L, Creutzenberg O, Heinrich U (1996). The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. *Toxicol Lett* **88**(1-3) 15-21.
- Donaldson K, MacNee W (2001). Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM10). *Int J Hyg Environ Health* **203**(5-6) 411-415.
- Donaldson K, Li XY, MacNee W (1998). Ultra-fine (nanometer) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci* **29**, 553-560.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W (2001). Ultra-fine particles. *Occup Environ Med* **58**(3) 211-216, 199.
- Dreher KL. (2000). Particulate matter physicochemistry and toxicology: In search of causality - A critical perspective. *Inhal Toxicol* **12**, 45-57.
- Fahy O, Tsicopoulos A, Hammad H, Pestel J, Tonnel AB, Wallaert B (1999). Effects of diesel organic extracts on chemokine production by peripheral blood mononuclear cells. *J Allergy Clin Immunol* **103**(6) 1115-1124.
- Gallagher J, Heinrich U, George M, Hendee L, Phillips DH, Lewtas J (1994). Formation of DNA adducts in rat lung following chronic inhalation of diesel emissions, carbon black and titanium dioxide particles. *Carcinogenesis* **15**(7) 1291-1299.
- Ghio AJ, Richards JH, Carter JD, Madden MC (2000). Accumulation of iron in the rat lung after tracheal instillation of diesel particles. *Toxicol Pathol* **28**(4) 619-627.

- Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM (2002). Biologic effects of oil fly ash. *Environ Health Perspect* **110** (Suppl. 1) 89-94.
- Gilmour PS, Brown DM, Lindsay TG, Beswick PH, MacNee W, Donaldson K (1996). Adverse health effects of PM10 particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup Environ Med* **53**(12) 817-822.
- Gilmour P, Brown DM, Beswick PH, Benton E, MacNee W (1997). Surface free radical activity of PM10 and ultra-fine titanium dioxide: a unifying factor in their toxicity? *Ann Occup Hyg* **41**, 32-38.
- Granum B, Lovik M (2002). The effect of particles on allergic immune responses. *Toxicol Sci* **65**(1) 7-17.
- Granum B, Gaarder PI, Lovik M (2000). Ige adjuvant activity of particles - What physical characteristics are important? *Inhal Toxicol* **12**, 365-372.
- Harrison RM, Yin J (2000). Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci Total Environ* **249**(1-3) 85-101.
- Hemenway DR, Clarke RP, Frank R, Jakab GJ (1996). Factors governing the mass loading of aerosolised carbon black particles with acid sulphates, inhalation exposure, and alveolar macrophage function. *Inhal Toxicol* **8**, 679-694.
- Heo Y, Saxon A, Hankins O (2001). Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology* **159**(3) 143-158.
- Hext PM, Rogers KO, Paddle GM (1999). *The health effects of PM2.5 (including ultra-fine particles)*. CONCAWE, Brussels. Report n° 99/60.
- Höhr D, Steinfartz Y, Schins RP, Knaapen AM, Martra G, Fubini B, Borm PJ (2002). The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultra-fine TiO₂ in the rat. *Int J Hyg Environ Health* **205**(3) 239-244.
- Iwai K, Higuchi K, Udagawa T, Ohtomo K, Kawabata Y (1997). Lung tumor induced by long-term inhalation or intratracheal instillation of diesel exhaust particles. *Exp Toxicol Pathol* **49**(5) 393-401.
- Jakab GJ, Clarke RW, Hemenway DR, Longphre MV, Kleeberger SR, Frank R (1996). Inhalation of acid coated carbon black particles impairs alveolar macrophage phagocytosis. *Toxicol Lett* **88**(1-3) 243-248.
- Jakab GJ, Hemenway DR (1993). Inhalation coexposure to carbon black and acrolein suppresses alveolar macrophages phagocytosis and TNF- α release and modulates peritoneal macrophage phagocytosis. *Inhal Toxicol* **5**, 275-289.
- Kanoh T, Suzuki T, Ishimori M, Ikeda S, Ohasawa M, Ohkuni H, Tunetoshi Y (1996). Adjuvant activities of pyrene, anthracene, fluoranthene and benzo(a)pyrene in production of anti-IgE antibody to Japanese cedar pollen allergen in mice. *J Clin Lab Immunol* **48**(4) 133-147.
- Li XY, Brown D, Smith S, MacNee W, Donaldson K (1999). Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultra-fine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* **11**(8) 709-731.
- Lison D, Lardot C, Huaux F, Zanetti G, Fubini B (1997). Influence of particle surface area on the toxicity of insoluble manganese dioxide dusts. *Arch Toxicol* **71**(12) 725-729.
- Lovik M, Hogseth AK, Gaarde, PI, Hagemann R, Eide I (1997). Diesel exhaust particles and carbon black have adjuvant activity on the local lymph node response and systemic IgE production to ovalbumin. *Toxicology* **121**(2) 165-178.

- Oberdörster G, Feri, J, Lehnert BE (1994). Correlation between particle size, *in vivo* particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* **102** (Suppl. 5) 173-179.
- Ohtoshi T, Takizawa H, Okazaki H, Kawasaki S, Takeuchi N, Ohta K, Ito K (1998). Diesel exhaust particles stimulate human airway epithelial cells to produce cytokines relevant to airway inflammation *in vitro*. *J Allergy Clin Immunol* **101**(6) 778-785.
- Osier M, Oberdörster G (1997). Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fundam Appl Toxicol* **40**(2) 220-227.
- Osunsanya T, Prescott G, Seaton A (2001). Acute respiratory effects of particles: mass or number? *Occup Environ Med* **58**(3) 154-159.
- Penttinen P, Timonen KL, Tiittanen P P, Mirme A, Ruuskanen J, Pekkanen J (2001). Ultra-fine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics. *Eur Respir J* **17**(3) 428-435.
- Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultra-fine particles. *Am J Respir Crit Care Med* **155**(4) 1376-1383.
- Prieditis H, Adamson IY (2002). Comparative pulmonary toxicity of various soluble metals found in urban particulate dusts. *Exp Lung Res* **28**(7) 563-576.
- Ress NB, Chou BJ, Renne RA, Dill JA, Miller RA, Roycroft JH, Hailey JR, Haseman JK, Bucher JR (2003). Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicol Sci* **74**(2) 287-296.
- Reynolds LJ, Richards RJ (2001). Can toxicogenomics provide information on the bioreactivity of diesel exhaust particles? *Toxicology* **165**(2-3) 145-152.
- Sagai M, Saito H, Ichinose T, Kodama M, Mori Y (1993). Biological effects of diesel exhaust particles. I. *In vitro* production of superoxide and *in vivo* toxicity in mouse. *Free Radic Biol Med* **14**, 37-47.
- Salvi S, Holgate ST (1999). Mechanisms of particulate matter toxicity. *Clin Exp Allergy* **29**(9) 1187-1194.
- Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL (2000). Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med* **343**(24) 1742-1749.
- Suzuki T, Kanoh T, Kanbayashi M, Todome Y, Ohkuni H (1993). The adjuvant activity of pyrene in diesel exhaust on IgE antibody production in mice. *Arerugi* **42**(8) 963-968.
- Takenaka H, Zhang K, Diaz-Sanchez D, Tsien A, Saxon A (1995). Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. *J Allergy Clin Immunol* **95**, 1 Pt 1, 103-115.
- Terada N, Maesako K, Hiruma K, Hamano N, Houki G, Konno A, Ikeda T, Sai M (1997). Diesel exhaust particulates enhance eosinophil adhesion to nasal epithelial cells and cause degranulation. *Int Arch Allergy Immunol* **114**(2) 167-174.
- Tsien A, Diaz-Sanchez D, Ma J, Saxon A (1997). The organic component of diesel exhaust particles and phenanthrene, a major polyaromatic hydrocarbon constituent, enhances IgE production by IgE-secreting EBV-transformed human B cells *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* **142**(2) 256-263.
- Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V (2002). Interactions between ultra-fine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* **184**(3) 172-179.

- Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A (2004). Quinones and Aromatic Chemical Compounds in Particulate Matter (PM) Induce Mitochondrial Dysfunction: Implications for Ultrafine Particle Toxicity. *Environ Health Perspect* **112(14)** 1347-1358.
- Yang HM, Barger MW, Castranova V, Ma JK, Yang JJ, Ma JY (1999). Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbon black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: Evidence of DEP suppression of macrophage activity. *J Toxicol Environ Health A* **58(5)** 261-278.
- Zhang Q, Kusaka Y, Donaldson K (2000). Comparative pulmonary responses caused by exposure to standard cobalt and ultra-fine cobalt. *J Occup Health* **42**, 179-184.
- Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, Nakakuki K, Kohyama N, Donaldson K (1998). Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultra-fine metals: role of free radicals. *J Toxicol Environ Health A* **53(6)** 423-438.

2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques adsorbés

S. Binet

2.1. Contexte

Les mécanismes toxicologiques impliqués dans les pathologies induites par l'exposition aux polluants atmosphériques sont le sujet d'un grand intérêt scientifique avec, en particulier, l'étude du lien entre propriétés physicochimiques et toxicité des particules. Deux questions peuvent être ainsi posées : a) quelle est l'influence de leur composition chimique ? et b) quelle est l'influence de leur taille ?

Les particules atmosphériques sont souvent constituées d'un « noyau » solide carboné sur lequel sont adsorbées des molécules chimiques de diverses provenances, collectivement désignées par l'expression « fraction organique ». Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (désignés par HAP par la suite) et les hétérocycles ou leurs dérivés, formés par la combustion incomplète des carburants fossiles (transports, centrales électriques...), sont une des classes de composés contenus dans la fraction organique des particules fines. Plusieurs ont été reconnus comme cancérogènes pour l'animal (IARC, 1983, 1985 ; IPCS, 1998) et sont, par conséquent, susceptibles de présenter un danger pour l'homme (Adonis et Gil, 2000). Ils peuvent non seulement exercer une activité biologique par eux-mêmes, mais aussi au travers de nitroarènes (dérivés nitrés cancérogènes formés lors de réactions photochimiques ; Pitts et coll., 1985). Cette fraction organique pourrait donc représenter un paramètre critique de la toxicité des particules. En 1996, l'IARC classait le noir de carbone (CB) dans le groupe 2B et concluait à sa toxicité *via* un mécanisme de surcharge pulmonaire entraînant une inflammation chronique.

La contribution de la toxicité spécifique des HAP à la surface de ces particules était rejetée, en particulier parce que les particules de CB contiennent environ 100 fois moins de matériel organique extractible par solvant que les particules émises par les moteurs diesels (désignées PED par la suite). La question reste cependant ouverte, du fait des incertitudes relatives à la transposition des études expérimentales pour évaluer le risque potentiel chez l'homme. En effet, Harrison et coll. (2004) remarquaient qu'aux concentrations environnementales (c'est-à-dire à des concentrations très inférieures à celles provoquant une surcharge chez l'animal), on ne pouvait exclure que la composition de la particule puisse jouer un rôle important dans la survenue de cancers. Cette hypothèse paraît d'autant plus fondée pour les PUF, qui présentent un ratio surface/masse très important. En 1990, Lindenschmidt et Witschi signalaient qu'un plus grand nombre de tumeurs semblaient se développer à la suite d'une exposition à des HAP liés aux particules qu'après une exposition au matériel organique seul. Ceci amenait Schlesinger (1995) à évoquer le rôle de la différence de biodisponibilité des composés organiques dans les poumons, suivant qu'ils sont inhalés adsorbés sur des particules ou en tant que composés purs (par exemple Sun et coll., 1984), et les conséquences en termes de potentiel cancérigène.

Les particules ultra-fines (PUF) pourraient jouer un rôle central dans les effets attribués aux PM_{2,5} (Oberdörster et Utell, 2002 ; Samet et coll., 2000). Les PUF sont notamment présentes dans les fumées de combustion des carburants fossiles (HEI, 2002). Du fait de leur très petite taille, de leur grand nombre et de leur très grande surface spécifique par unité de masse, les PUF ont des caractéristiques uniques, incluant une plus grande capacité d'adsorption des agents chimiques organiques et une capacité à pénétrer dans les cellules du tractus respiratoire (Frampton, 2001 ; HEI, 2002 ; Nemmar et coll., 2002 ; Oberdörster, 1996 ; Utell et Frampton, 2000). Des données abondantes existent sur les particules diesels (PED) dont le spectre granulométrique est large, mais le fonds documentaire liant les PUF aux HAP est très limité tant sur le plan expérimental qu'*a fortiori* épidémiologique. Les PUF, qui présentent des caractéristiques spécifiques par rapport aux plus grosses particules, pourraient exercer des effets directs sur les cellules du tractus respiratoire (bronchioles terminales et alvéoles). Elles pourraient aussi traverser le mucus des bronches et atteindre les cellules épithéliales. Il a de plus été montré que le TiO₂ ultra-fin ayant pénétré dans les cellules pulmonaires n'était pas entouré d'une membrane et donc avait traversé la membrane plasmique de la cellule sans phagocytose (Geiser et coll., 2005). De plus, les PUF présentent une plus grande surface spécifique, et peuvent donc apporter plus de HAP *in situ*. Enfin, leur taille pourrait leur permettre d'atteindre le noyau cellulaire et agir directement sur l'ADN ou les protéines liées à l'ADN.

L'analyse bibliographique proposée ici n'a pas pour objet l'exhaustivité, mais plutôt une présentation générale des débats de la communauté scientifique sur ce sujet, articulée autour des effets comparés des particules de carbone pur, des HAP adsorbés et des PED.

2.2. Caractérisation physicochimique des particules carbonées

Des particules de noir de carbone (CB) sont utilisées dans les protocoles expérimentaux visant à comprendre l'effet spécifique des HAP adsorbés et/ou déposés sur les PED. En effet, semblables aux PED, ces particules contiennent environ 100 fois moins de molécules organiques, en particulier de composés mutagènes et cancérigènes.

Les agents adsorbés sur les PED comprennent des molécules de 2 à 5-6 cycles, leurs analogues alkylés ou nitrés (nitroarènes) ainsi que des hétérocycles de structures similaires, oxygénés, azotés ou soufrés (May, 1992 ; Ono-Ogasawara, 2004). Ces composés polycycliques présentent des points d'ébullition largement supérieurs à 100 °C. En termes de toxicité, on distingue tout particulièrement des composés cancérigènes : HAP, nitro-HAP et dérivés oxydés des HAP. Il est donc particulièrement important de distinguer les effets propres des PUF de ceux susceptibles d'être induits par les composés adsorbés à leur surface.

Les PED sont composées de carbone élémentaire (5 à 40 % pour Morawska et coll., 2004). Le reste se répartit en 30 % de substances carbonées organiques et 30 % de sulfates, d'eau, de cendres et autres composés. Les PED sont constituées par l'agrégation de particules primaires de carbone élémentaire amorphe d'environ 1 nm de diamètre entourées de feuillets de carbone microcristallin (Ishiguro et coll., 1997). Les particules élémentaires s'assemblent en agglomérats (de 20-500 nm à un diamètre maximal de 30 µm) contenant des centaines de composés chimiques organiques solubles en phase solvant (WHO, 1996 ; Kittelson, 1998). Les HAP s'adsorbent ou se condensent sur ces particules de carbone (Tobias et coll., 2001). La cinétique de condensation hétérogène des vapeurs sur les particules montre un enrichissement de la quantité de condensat par unité de masse des particules en fonction de la diminution de la taille des particules : puisque le taux de condensation des vapeurs est proportionnel à la surface des PUF, la concentration en agents chimiques adsorbés est proportionnelle à leur surface spécifique (BIA, 2003). Une étude de l'US-EPA, publiée en 1996 et reprise dans la publication de Harrison et Yin (2000), illustre cette différence dans la concentration de carbone organique en fonction de la classe granulométrique : PM_{10} (8,5 %) vs $PM_{2,5}$ (20,9 %) à l'Est des États-Unis, et PM_{10} (30 %) vs $PM_{2,5}$ (38,9 %) à l'Ouest. Par ailleurs, comme le suggère l'étude de Tuhackova et coll. (2001), il est vraisemblable que la composition qualitative en HAP des particules varie en fonction de leur granulométrie. En effet, ces auteurs ont remarqué dans les sols des compositions en HAP différentes en fonction de la distance de prélèvement par rapport à la route.

Bien que les PUF environnementales ne représentent que 1-2 % en masse des PM_{10} , elles contiennent 39-62 % des HAP des aérosols urbains (Venkataraman, 1998). En Californie du Sud (Cass et coll., 2000), ces PUF présentent un diamètre aérodynamique

moyen de 56 à 100 nm pour une concentration massique de 0,55 à 1,16 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (moyenne pour l'ensemble des sites : 0,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Leur composition chimique diffère de celle des PED : composés organiques 32-67 % (moy. 50 %), carbone élémentaire 3,5-17,5 % (moy. 8,7 %), sulfate 1-18 % (moy. 8,2 %), nitrate 0-19 % (moy. 6,8 %), ammonium 0-9 % (moy. 3,7 %), oxydes métalliques 1-26 % (moy. 14 %). Selon Venkataraman (1998), il existe dans ces PUF une prédominance des HAP non volatils (pression de vapeur $P_v < 10^{-7}$ Pa : benzo[a]pyrène, benzo[ghi]pérylène, coronène) par rapport aux HAP semi-volatils ($P_v > 10^{-7}$ Pa : fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène).

2.3. Cinétique et métabolisme (homme et animaux)

De nombreux polluants organiques sont adsorbés sur des particules relativement inertes et insolubles. L'exemple le plus représentatif est celui des PED dont les HAP, adsorbés sur les particules de carbone, ne sont pas directement toxiques mais nécessitent une activation métabolique pour exercer leur toxicité. Leur désorption est par conséquent nécessaire et il paraît indispensable de distinguer les demi-vies d'élimination (clairance) des particules d'une part et de désorption des HAP liés d'autre part.

2.3.1. Dépôt pulmonaire des PED

Les caractéristiques du dépôt des particules dans les régions du tractus respiratoire présentent un intérêt certain pour la compréhension des effets toxicologiques potentiels des HAP (voir chapitre 3 point 1).

Les PED, qui présentent un diamètre aérodynamique médian (D_{aem}) de 200 nm, subissent une filtration nasale et l'efficacité de dépôt pulmonaire est seulement légèrement supérieure à la valeur minimale trouvée pour les particules d'environ 500 nm de D_{aem} . Venkataraman et Raymond (1998) ont estimé, à l'aide d'un modèle anatomique pulmonaire, qu'environ 25 % de la masse des HAP d'un aérosol urbain se déposerait dans la zone pulmonaire et 3 % dans la zone trachéobronchique. Dix à 15 % des PED se déposent dans la région alvéolaire chez le rat, pour environ 10 % chez l'homme (WHO, 1996). Par ailleurs, les résultats de Bond et coll. (1990) indiquent que la fraction déposée dans le tractus respiratoire chez le rat est indépendante de la concentration d'exposition ou du type d'aérosol pour une gamme de concentrations de 50 à 1 100 ng/L . Ce résultat a été confirmé par Nikula et coll. (2000) chez des rats exposés pendant 24 mois à des concentrations en PED de 0,35 à 7,0 mg/m^3 . Ils ont aussi estimé que 80 à 85 % des PED étaient localisées dans les alvéoles et les bronchioles terminales, soit à l'intérieur des macrophages soit dans les lumières. En revanche, chez l'homme (mineurs de charbon),

ces mêmes auteurs ont montré que 57 à 91 % des particules étaient localisées dans l'interstitium pulmonaire (le pourcentage observé étant lié à la dose reçue).

2.3.2. Rétention et clairance pulmonaire des particules et des HAP adsorbés (biodisponibilité)

Durant la combustion dans les moteurs diesels, des PUF sont formées, ainsi que des HAP en phase gazeuse. Lorsque les fumées se refroidissent, les HAP se déposent à la surface de la particule, d'abord par adsorption, puis par condensation. La biodisponibilité des HAP et par conséquent leur niveau de solubilisation dans le liquide de la surface broncho-alvéolaire sont fonction des forces de liaison des HAP avec la surface des particules. Cette force de liaison, très élevée lorsque la surface est faiblement recouverte (adsorption), décroît rapidement lorsque la concentration d'HAP augmente à la surface de la particule (condensation ; Gerde et coll., 2001b).

Une synthèse de l'Organisation mondiale de la santé sur les fumées diesels (OMS, 1996) fait le point des travaux publiés. « L'élimination des particules par l'ascenseur mucociliaire est pratiquement complète au bout de 24 heures. L'élimination à long terme des particules déposées dans la zone alvéolaire a fait l'objet de plusieurs études sur des rats qui avaient été exposés par la voie respiratoire à deux types de particules : des particules émises par un moteur diesel et des particules servant de référence. Dans le cas des témoins, chez lesquels la charge pulmonaire était faible (< 1 mg par poumon), on a obtenu des temps de demi-élimination pulmonaire de l'ordre de 60 à 100 jours, alors que chez les rats présentant une charge pulmonaire allant de 1 à 60 mg/poumon, le temps de demi-élimination était de l'ordre de 100 à 600 jours. Dans plusieurs études, on a constaté que les effets observés étaient dus à une surcharge en particules, laquelle a été décrite chez diverses espèces et pour un certain nombre de matériaux particulaires. Ce phénomène s'observe généralement lorsque la vitesse de dépôt des particules de faible solubilité et de faible toxicité aiguë reste supérieure à leur vitesse d'élimination pendant une très longue durée. Chez l'homme, le temps de demi-élimination alvéolaire normal est de plusieurs centaines de jours, c'est-à-dire plus long que chez le rat. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents dans la suie émise par les moteurs diesels adhèrent fortement à la surface des particules. Environ 50 % des HAP adsorbés sur les particules sont éliminés par les poumons dans l'espace d'une journée, mais le temps de demi-rétention de la fraction restante s'est révélé égal à 18-36 jours. Des études portant sur du ³H-benzo[a]pyrène et du ¹⁴C-nitropyrrène ont montré que lorsqu'ils sont associés à des particules, les HAP sont sensiblement plus longs à être éliminés des poumons que leurs homologues libres. » Pour ce dernier point, le rapport de l'OMS fait référence à une étude de Bond et coll. (1986) qui a porté sur des rats mâles exposés à des aérosols de nitropyrrène marqué au carbone 14 ([¹⁴C]NP) ou des aérosols de PED

couverts de [^{14}C]-NP (50-1 100 ng/l). Une heure après la fin de l'inhalation, les poumons des rats exposés au PED-[^{14}C]NP contenaient près de 5 fois plus de ^{14}C (148 pmol/g) que les rats exposés au [^{14}C]NP seul (29 pmol/g). Quatre vingt quatorze heures après la fin de l'inhalation, ce rapport passait de 5 à 80 (80 pmol/g contre 1 pmol/g).

Dans l'étude de Gerde et coll. (2001a et b), les auteurs ont administré chez trois chiens un aérosol de PED recouvertes de B[a]P marqué au tritium (^3H -B[a]P). La quantité déposée sur chaque particule correspondait en moyenne à une couche monomoléculaire recouvrant 25 % de la surface. Dans les quelques minutes suivant l'exposition, du B[a]P libre était détecté dans le sang, mais sa concentration chutait rapidement. Six mois après, la plupart du B[a]P restant (16 % de la surface) était sous la forme liée aux particules dans le tissu pulmonaire périphérique et les noyaux lymphatiques, et était considéré comme non biodisponible.

Il est enfin possible que les HAP faiblement liés aux PUF passent directement à travers la membrane cellulaire sans que la particule soit internalisée. Ce mécanisme a récemment été montré *in vitro* par Penn et coll. (2005) sur une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines incubées en présence de PUF issues de la combustion du 1,3-butadiène, très riches en HAP (> 90 %).

2.3.3. Métabolisme et stress oxydant des HAP

Le stress oxydatif induit par les particules est un événement hiérarchique caractérisé par l'induction d'une réponse antioxydante et cytoprotectrice pour un faible stress oxydatif et par des réponses proinflammatoires et cytotoxiques pour les hauts niveaux de stress oxydatif (Li et coll., 2002 ; Xiao et coll., 2003). La question clé est de déterminer si ces effets sont induits par la particule elle-même ou par les composés chimiques présents à sa surface, tels que les HAP. C'est pourquoi des auteurs ont étudié comparativement les capacités à induire un stress oxydant des particules de carbone, des HAP, des PED et d'extraits organiques réalisés à partir des PED.

Les HAP peuvent indirectement induire un stress oxydatif après leur biotransformation en quinones par le cytochrome P-450, l'époxyde hydrolase et la dihydrodiol déshydrogénase comme le montre la figure 8.1 (Burczynski et coll., 1999).

Li et coll. (2003) ont travaillé sur des concentrats de particules environnementales (CPE) de différentes classes granulométriques afin d'étudier le stress oxydatif induit sur des macrophages et des cellules épithéliales en culture. Les PUF de ces CPE présentaient une proportion très élevée de HAP, de carbone organique et élémentaire. Ils ont démontré que les PUF induisaient un stress oxydatif beaucoup plus important que les $\text{PM}_{2,5}$ et les PM_{10} . Ils ont aussi corrélé cet effet des PUF à la proportion d'HAP.

Les effets pro-inflammatoires ont été liés à la capacité des particules, telles que les PED, à générer des espèces activées de l'oxygène (EAO) et du stress oxydatif dans les

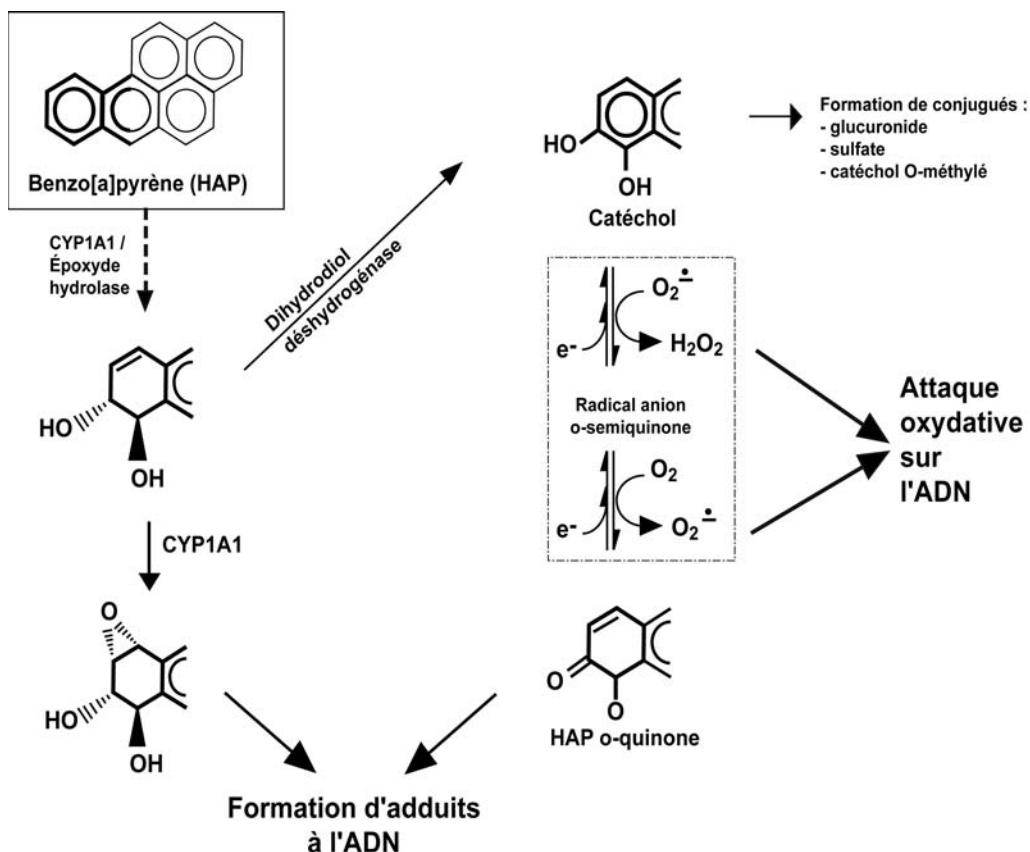


Figure 8.1. Schéma métabolique de l'activation des HAP.

macrophages, les cellules épithéliales bronchiques et les microsomes pulmonaires (Gurgueira et coll., 2002 ; Hiura et coll., 1999 ; Kumagai et coll., 1997 ; Nel et coll., 2001). Les PED et les extraits organiques réalisés à partir des PED présentent la même capacité à former des EAO (Hiura et coll., 1999 ; Kumagai et coll., 1997). L'implication des quinones et des HAP a été confirmée par des expériences montrant que les fractions polaires et aromatiques des extraits de PED avaient les mêmes effets pro-oxydatifs que la particule intacte au niveau des cellules épithéliales bronchiques et dans les macrophages (Li et coll., 2002).

Baulig et coll. (2003) ont, eux aussi, détecté une production dose-dépendante d'EAO dans des cultures de cellules épithéliales bronchiques et nasales exposées à des PED, des extraits organiques de PED ainsi qu'à plusieurs HAP (phénanthrène, 1-nitropyrrène). En revanche, des particules de carbone ultra-fines, mimant la partie carbonée des PED, n'augmentaient pas la production d'EAO. Les PED et les extraits organiques de PED induisaient aussi l'expression de gènes tels que le CYP-1A1, suggérant que les composés organiques des particules devenaient biodisponibles et étaient métabolisés.

Xia et coll. (2004) ont cherché à savoir si les effets sur la fonction mitochondriale médiés par le stress oxydant étaient dus à un effet particule ou aux composés chimiques adsorbés sur ces particules. Dans un protocole *in vitro* sur des cellules RAW 264.7 (lignée cellulaire macrophagique dérivée de tumeurs induite chez la souris BALB/c mâle), ils ont montré que les composés aliphatiques, aromatiques et polaires, fractionnés à partir des PED, exerçaient des effets différents. En particulier, la fraction polaire enrichie en quinones induisait un effet plus prononcé que la fraction aromatique (HAP) pour la formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), la diminution du potentiel membranaire, la perte des membranes des mitochondries et l'induction de l'apoptose. Ces effets sur les mitochondries ont été reproduits avec des PED intacts ainsi qu'avec des PUF atmosphériques, tandis que des nanoparticules de polystyrène n'induisaient aucun effet. Les auteurs concluaient que ces effets étaient bien médiés par des composés chimiques adsorbés à la surface des particules confirmant, à un niveau subcellulaire, les résultats précédents de Hiura et coll. (1999) sur les macrophages.

Takano et coll. (2002) ont confirmé l'induction du CYP 1A1 (et de la synthèse du P450 1A1) après instillation intratrachéale de PED chez la souris. Le témoin de charbon activé ne présentait pas cet effet. Ces résultats montrent que les HAP des PED peuvent être impliqués dans la génération d'EAO.

Comme l'ont souligné Xia et coll. (2004), il ressort de cet ensemble de travaux que tant les particules que les molécules chimiques adsorbées à leur surface sont importantes :

- les particules agissent comme des transporteurs de composés chimiques dont certains, notamment les semi-volatils, n'atteindraient pas autrement les parties profondes du poumon ;
- la surface de la particule peut agir comme un catalyseur de réactions chimiques génératrices d'EAO ;
- il est probable que la localisation intracellulaire des particules phagocytées soit influencée par les composants chimiques de leur surface.

En conclusion, il semble bien établi que la partie organique des particules induit la formation d'EAO. Enfin, il n'est pas exclu qu'une partie de la production d'EAO soit due aux métaux de transition présents en surface des particules (Cu, Fe, Mn, Ni ; voir point 3).

2.3.4. Formation d'adduits

Les HAP des PED, dont le benzo[a]pyrène, subissent une métabolisation oxydante au niveau du poumon et dans des cultures cellulaires de macrophages pulmonaires, aboutissant à la formation de phénols, de diols et de quinones. Ces dérivés oxydés sont susceptibles de s'adduire à l'ADN. Les adduits sur les bases de l'ADN sont susceptibles

de conduire à des mutations. Si ces mutations ne sont pas réparées, et si elles portent sur des gènes clés, la cellule peut devenir cancéreuse (Wogan et coll., 2004).

Wolff et coll. (1989) ont exposé des rats F344 à deux types d'aérosols : du [^{14}C]B[a]P seul (2 mg/m^3) et du B[a]P adsorbé sur des particules de carbone (97 mg/m^3 contenant 2 mg/m^3 de [^{14}C]B[a]P). Les résultats montrent que les poumons contenaient 100 fois plus de ^{14}C dans le groupe ayant inhalé le B[a]P adsorbé sur des particules de carbone à la fin de l'exposition. La demi-vie d'élimination du ^{14}C était allongée à 34 semaines, contre 6 semaines pour le groupe [^{14}C]B[a]P seul. Les niveaux d'adduits n'étaient pas significativement différents entre les deux groupes (respectivement 11 et 7 pour 10^9 bases). Il est intéressant de noter la faiblesse des taux d'adduits malgré la très forte dose de B[a]P reçue par les animaux des deux groupes.

Bond et coll. (1990a, 1990b) n'ont pas observé de différence de taux d'adduit entre des rats exposés à un aérosol de PED ou exposés à des particules de carbone (à la même concentration de $6,2\text{ mg/m}^3$). De plus, les taux d'adduits ne variaient pas dans un intervalle de concentrations en PED compris entre $0,35$ et 10 mg/m^3 et déclinaient très rapidement après la fin de l'exposition.

Gallagher et coll. (1994) ont exposé des rats Wistar pendant deux ans à des PED ($7,5\text{ mg/m}^3$; 30 % de matières organiques adsorbées), des particules de carbone ($11,3\text{ mg/m}^3$; < 0,1 % de matières organiques adsorbées) et des particules de TiO_2 ($10,4\text{ mg/m}^3$). Ils n'ont observé aucune augmentation significative d'adduits dérivés des HAP dans le groupe exposé au PED.

Les travaux de Borm et coll. (2005) permettent d'affiner les données précédentes. Ces auteurs ont travaillé sur quatre échantillons commerciaux de CB ultra-fins (surfaces spécifiques comprises entre 20 et $300\text{ m}^2/\text{g}$) contenant une faible concentration en HAP. Ils ont évalué (1) leur biodisponibilité (relargage d'HAP en solution saline avec ou sans surfactant et (2) leur capacité à former des adduits à l'ADN *in vitro* sur des cellules épithéliales pulmonaires ($30\text{-}300\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$), et *in vivo* en exposant des rats pendant 13 semaines à une atmosphère de 50 mg/m^3 . Ils n'ont observé aucun relargage de HAP en solution. Les cellules incubées *in vitro* ne forment pas d'adduit à l'exception de l'échantillon le plus riche en B[a]P, mais sans lien quantitatif avec la concentration de l'échantillon déposé sur la culture. En revanche, *in vivo*, cet échantillon n'induisait pas la formation d'adduit pulmonaire. Ces résultats montrent que les HAP de ces échantillons sont très fortement liés à la matrice carbonée. Finalement, les auteurs doutent que les HAP jouent un rôle significatif dans l'induction de tumeurs pulmonaires chez le rat après inhalation de noirs de carbone fins et ultra-fins.

En conclusion, certains dérivés organiques dont le B[a]P, présents dans les émissions de moteurs diesels, sont capables de former des adduits avec l'ADN ; toutefois (1) le noyau carboné lui-même (sans composés organiques extractibles) peut également conduire à la formation d'adduits et (2) quand des adduits sont formés (échantillons contenant des

HAP), ils sont en quantité très inférieure aux estimations théoriques. En dépit du faible nombre de travaux réalisés postérieurement au classement dans le groupe 2B en 1996 par l'IARC, le mécanisme de la toxicité du CB *via* un mécanisme de surcharge pulmonaire entraînant une inflammation chronique et non pas *via* une toxicité spécifique des HAP à la surface de ces particules ne semble pas devoir être remis en cause.

2.4. Études expérimentales sur le rôle des HAP dans les effets physiopathologiques des particules de carbone

2.4.1. Effet inflammatoire et HAP des particules de carbone

Bien que les données épidémiologiques ne soient pas actuellement concluantes, l'exposition aux PED est mise en cause dans l'induction de l'asthme et du cancer. Le rôle de l'inflammation a été souligné pour ces deux pathologies. Différentes équipes se sont attachées à comprendre si la réponse inflammatoire observée était liée à un effet particule et/ou aux molécules organiques attachées à leur surface. Les exemples qui suivent ne sont que le reflet d'une abondante littérature. On se reportera pour plus de détails à la revue de Granum et Lovik (2002) et au rapport australien de Morawska et coll. (2004).

Les travaux de Boland et coll. (1999, 2000) montrent une nette implication des composés organiques des PED. En effet, *in vitro* et à des concentrations non cytotoxiques, les PED qui sont phagocytés par les cellules épithéliales bronchiques humaines induisent une émission de cytokines proinflammatoires (IL-8, IL-1 β et GM-CSF ou Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor), lesquelles sont impliquées dans la maladie allergique. Cette réponse paraît dépendre des composés organiques adsorbés, puisque les particules de carbone induisent une réponse plus faible. D'autre part, cette réponse ne serait pas dépendante des métaux puisque l'ajout de desferrioxamine (chélateur de métaux) ne l'inhibe pas. En revanche, l'ajout d'agents piégeant les radicaux libres inhibe le relargage de GM-CSF induit par les PED et montre l'implication des EAO dans cette réponse. La réponse pro-inflammatoire comprend non seulement l'expression d'interleukines mais aussi un afflux de polymorphonucléaires neutrophiles (par exemple Yanagisawa et coll., 2003).

Bonvallot et coll. (2001) ont comparé les effets des PED, des extraits organiques de PED, des particules carbonées provenant de PED desquels ont été extraites les molécules organiques et des particules de carbone. Ils ont montré que la réponse pro-inflammatoire induite par les PED dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire implique principalement les composés organiques (HAP), lesquels induisaient l'expression du

cytochrome 1A1 (CYP 1A1). Parallèlement, les particules carbonées de PED sans molécules organiques ainsi que les particules de carbone induisaient une réponse pro-inflammatoire significative, mais plus faible. Les propriétés pro-inflammatoires des particules de carbone ont été confirmées par instillation intratrachéale de CB chez le rat (Dick et coll., 2003), qui montre un lien entre l'inflammation et la génération de stress oxydant (afflux de neutrophiles, augmentation de la protéine inflammatoire macrophagique MIP-2). Ces auteurs ont aussi noté l'apparition d'un stress oxydant sur des molécules purifiées d'ADN incubées avec du CB.

En résumé, les travaux expérimentaux montrent l'apparition d'un processus inflammatoire dès lors que des animaux ou des cellules sont exposés aux HAP des PED. Les effets des particules sur la réponse immunitaire s'expliquent non seulement par la présence de HAP, mais aussi par la granulométrie et la surface. Ces différents éléments contribuent à l'apparition d'un stress oxydatif qui serait à l'origine de l'inflammation. Ce stress est aussi observé avec des particules de CB, mais apparemment dans une plus faible mesure. Cette observation montre la nécessité de bien considérer les tailles des particules lorsque plusieurs publications sont comparées, car l'importance de l'effet pro-inflammatoire observé est inversement proportionnel à la taille, comme l'ont montré Donaldson et coll. (2000) et Gilmour et coll. (2004). Enfin, il est à noter que les réponses pulmonaires après une instillation intratrachéale sont plus importantes qu'après une inhalation, ceci étant probablement dû à des différences dans la dose effective reçue par le poumon ainsi que dans la répartition des particules.

2.4.2. Effet cancérigène et HAP des particules de carbone

Un certain nombre d'études comparant les effets cancérigènes des PED et des particules de CB chez l'animal ont été réalisées, mais n'ont pas montré de différences significatives. En témoigne l'étude de Mauderly et coll. (1994) chez le rat par inhalation exposé 16 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 24 mois à 2,5 ou 6,5 mg/m³ de PED ou de CB. Les deux types de particules induisaient des altérations du tissu pulmonaire (inflammation, prolifération cellulaire et fibrose), dont l'étendue et l'importance croissaient avec la concentration d'exposition. Les auteurs ont aussi constaté une accumulation des particules aux deux concentrations, entraînant un blocage des mécanismes d'épuration normaux à partir du troisième mois d'exposition. Aucune différence n'a été observée dans l'incidence, le nombre et les types de tumeurs pulmonaires. En accord avec des études précédentes, ces résultats suggéraient deux conclusions : (1) la partie alvéolaire des aérosols était principalement responsable des cancers pulmonaires observés chez le rat et (2) les composés mutagènes adsorbés sur les particules jouaient un rôle mineur dans le développement des tumeurs. Les auteurs insistaient sur le lien

entre l'apparition des tumeurs et les conséquences du blocage des mécanismes d'épuration normaux. Par ailleurs, ils notaient que la réponse tumorigène observée chez le rat ne l'était pas chez le hamster ou chez la souris, pour laquelle les données étaient considérées comme équivoques.

Constatant que l'inhalation de PED chez le rat provoquait l'apparition de tumeurs (voir revue de Nikula, 2000), Randerath et coll. (1995) se faisaient l'écho d'autres scientifiques et proposaient trois hypothèses susceptibles de rendre compte de cet effet : (1) les composés organiques de la surface des particules interagissent avec l'ADN du tissu pulmonaire en formant des adduits, lesquels peuvent entraîner des mutations ; (2) l'exposition prolongée à une forte concentration de PED diminue l'épuration pulmonaire induisant de l'inflammation, une prolifération cellulaire puis un cancer ; et (3) l'action initiatrice des composés organiques (adduit puis mutation) et l'action promotrice de l'inflammation et de la prolifération cellulaire sont responsables de la réponse tumorigène. Cette troisième hypothèse sur l'origine du développement des tumeurs s'appuyait sur l'hypothèse de la responsabilité de la réponse inflammatoire tumorigène et sur les doutes, qu'on ne pouvait pas exclure, concernant la contribution des HAP, en particulier ceux qui sont reconnus cancérogènes.

L'analyse publiée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 1996) se faisait l'écho des doutes de la communauté scientifique sur la responsabilité des HAP d'après les travaux tant *in vitro* qu'*in vivo*. *In vitro*, la plupart des épreuves de génotoxicité avaient été réalisées avec des extraits d'émissions de moteurs diesels plutôt qu'avec les émissions totales elles-mêmes. Le fait que des réactions positives aient été obtenues en l'absence d'activation métabolique impliquait que ces effets génotoxiques étaient indépendants de la présence d'HAP. Les études *in vivo* de mutagenèse avaient donné globalement des résultats négatifs : les seuls résultats positifs consistaient en l'échange de chromatides sœurs dans le cas des émissions totales et des extraits organiques, et en la présence de micronoyaux dans le cas des extraits organiques. Lors d'études *in vivo* sur la cancérogénicité des émissions de moteurs diesels, au cours desquelles des rats étaient exposés par inhalation, on avait constaté que la phase gazeuse (c'est-à-dire dépourvue de particules) n'était pas cancérogène. Toutes les études sur des rats qui ont été validées dans cette analyse de l'OMS ont montré que les émissions de moteurs diesels avaient un effet cancérogène lorsque la concentration en particules était supérieure à 2 mg/m³, soit l'équivalent d'une exposition continue à une concentration d'environ 1 mg/m³. Aucun effet n'avait été observé en revanche chez les hamsters et les souris. Lors d'études au cours desquelles on avait pratiqué une instillation intratrachéale, on a constaté que les particules présentes dans les émissions de moteurs diesels et le noir de fumée produisaient des tumeurs ; en outre, on avait observé l'existence d'une corrélation entre la surface spécifique des particules carbonées et leur potentiel tumorigène.

Postérieurement à l'analyse de l'OMS, les résultats sur le CB ont été confirmés par Driscoll et coll. (1996), qui indiquaient une concentration sans effet toxique (NOAEL ;

inflammation pulmonaire, réponse mutagène) de $1,1 \text{ mg/m}^3$ pour une exposition subchronique de 13 semaines chez le rat. Tokiwa et coll. (1999) montraient que l'injection intratrachéale de HAP mutagènes et cancérigènes chez la souris n'entraînait pas d'atteinte oxydante de l'ADN (formation de 8-OHdG) contrairement à l'injection de PED dont on avait extrait au préalable les substances organiques. En revanche, Don Porto Carero (2001) évaluant le caractère mutagène *in vitro* (test des comètes) sur des lignées de cellules humaines concluait positivement pour le CB et les PED, et négativement pour ces mêmes particules après extraction au dichlorométhane : une seule concentration sortait significativement positive pour les particules de CB après extraction. Enfin Gallagher et coll. (2003) précisaient, dans une étude subchronique par inhalation chez le rat, que des particules de carbone ultra-fines (Printex-90, 16 nm) induisaient la formation de 8-OHdG (à partir de 7 mg/m^3 ; NOAEL à 1 mg/m^3) et indiquaient que leurs résultats étaient cohérents avec l'hypothèse de l'inflammation.

Un groupe d'experts réunis par l'International Life Sciences Institute-Risk Science Institute (ILSI, 2000) sur la cancérigénicité des poussières faiblement solubles (dont les PED et le CB) concluait à la validité du « modèle rat » en l'absence de données mécanistiques infirmant ce modèle. Ce groupe ajoutait qu'il n'anticipait pas de risque de cancer pulmonaire chez l'homme en-deçà de doses induisant une inflammation et une prolifération cellulaire.

En conclusion, il ne semble pas, d'après les travaux de type expérimental, qu'il existe un lien causal entre les HAP de la surface des PED et le caractère tumorigène ou mutagène des PED. Plus vraisemblablement, les auteurs montrent qu'au-dessus d'un NOAEL de 1 mg/m^3 , les particules de carbone avec ou sans HAP provoquent une réponse inflammatoire pouvant être responsable des mutations (8-OHdG) et des tumeurs pulmonaires observées.

Conclusion

Les particules de type carboné (par exemple PED) sont probablement cause de nombreux effets sur la santé, mais l'origine précise de ces effets, particule elle-même et/ou composés organiques présents à sa surface, n'a toujours pas été déterminée sans ambiguïté. Les HAP et leurs dérivés, formés par la combustion incomplète des carburants fossiles, sont une des classes de composés contenus dans la fraction organique des particules fines. Un certain nombre d'entre eux sont cancérigènes et pourraient représenter un paramètre critique de la toxicité des particules. D'autres particules, telles que les CB, contiennent plus de 100 fois moins de composés organiques et peuvent ainsi permettre de différencier les effets propres aux particules elles-mêmes.

Après leur dépôt dans le système respiratoire, les particules peuvent subir plusieurs processus : élimination par le tapis mucociliaire, phagocytose par les cellules épithéliales,

phagocytose par les macrophages alvéolaires et/ou translocation dans le système lymphatique. Au cours de ces processus, les HAP adsorbés sur les particules peuvent être libérés et exercer des effets biologiques, après activation métabolique.

Une des avancées principales a été de montrer que les composants organiques et métalliques des particules pouvaient induire des effets pro-inflammatoires dans le poumon du fait de leur capacité oxydante (EAO). La question clé était de déterminer si ce stress était induit par la particule elle-même ou par la métabolisation des composés chimiques présents à sa surface tels que les HAP. C'est pourquoi des auteurs ont comparé les capacités à induire un stress oxydant des particules de carbone, des PED et des extraits organiques réalisés à partir des PED. Les PED et leurs extraits organiques présentent la même capacité à former des espèces activées de l'oxygène (EAO). En revanche, les particules de carbone ultra-fines, mimant la partie carbonée des PED, n'augmentaient pas la production d'EAO. Les PED et les extraits organiques de PED induisaient aussi l'expression de gènes tels que le CYP-1A1, suggérant que les composés organiques des particules devenaient biodisponibles et étaient métabolisés. Les particules des concentrats d'air ambiant ont permis de démontrer que les PUF sont plus efficaces que les particules fines ou grossières pour induire un stress oxydant. Cet effet peut être expliqué par les produits chimiques adsorbés (produits organiques et métaux) capables de produire des EAO et dont la répartition pourrait être différente entre les classes granulométriques, mais aussi par la localisation des PUF dans les mitochondries. En conclusion, il semble bien établi que la partie organique des particules induit la formation d'EAO.

Une hypothèse de la cancérogenèse induite par les HAP suppose que les HAP relargués par les PED subissent une métabolisation oxydante aboutissant à la formation de dérivés oxygénés susceptibles de s'adduire à l'ADN ; les adduits provoquent ensuite la formation de mutations, au niveau d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur, et agissent ainsi comme des initiateurs de la cancérogenèse. Certains HAP, présents dans les émissions de moteurs diesels, sont capables de former des adduits avec l'ADN ; toutefois (1) le noyau carboné lui-même (sans composés organiques extractibles) peut également conduire à la formation d'adduits, (2) quand des animaux sont exposés à des particules très enrichies en B[a]P, le taux d'adduits formés est en quantité très inférieure aux estimations théoriques et (3) à exposition identique chez le rat en PED ou en CB, il a été observé que les taux d'adduits ne sont pas significativement différents.

Le rôle de l'inflammation a été souligné dans la cancérogenèse pulmonaire expérimentale induite par l'exposition au PED. Différentes équipes se sont attachées à comprendre si la réponse inflammatoire observée était liée à un effet particule et/ou aux molécules organiques de leur surface. En résumé, les travaux expérimentaux montrent l'apparition d'un processus inflammatoire lorsque des animaux ou des cellules sont exposés aux PED ; la réponse induite est plus faible pour les particules de CB. De plus, l'importance de l'effet pro-inflammatoire observé est inversement proportionnel à la taille des particules.

Diverses études comparant les effets cancérogènes des PED et des particules de CB ont été réalisées mais n'ont pas montré de différences significatives. *In vitro*, des réactions positives ont été obtenues en l'absence d'activation métabolique, impliquant que les effets génotoxiques étaient indépendants de la présence d'HAP. Les études de mutagenèse *in vivo* ont donné globalement des résultats négatifs. *In vivo* par inhalation, toutes les études ont montré que les émissions de moteurs diesels avaient un effet cancérogène chez le rat lorsque la concentration en particules était supérieure à 2 mg/m³. Cependant, le carbone élémentaire ainsi que le dioxyde de titane sont aussi des cancérogènes pulmonaires pour des niveaux et des durées d'expositions similaires. Il semble acquis que les particules de carbone avec ou sans HAP provoquent une réponse inflammatoire pouvant être responsable des mutations et des tumeurs pulmonaires observées au-dessus d'un NOAEL de 1 mg/m³. Chez le rat, l'augmentation de l'incidence de cancer semble plus corrélée avec un phénomène d'inflammation pulmonaire qu'avec le taux de cancérogènes à la surface des particules. D'autres espèces comme le hamster et la souris sont moins sensibles. Il reste à déterminer si la réponse tumorigène chez le rat est une réaction spécifique de cette espèce, ou si ce phénomène est transposable à l'homme. De plus, les particules sont retenues différemment dans les poumons du singe, ce qui entraîne moins d'inflammation que dans le poumon de rat. Harrison et coll. (2004) ont publié une analyse concernant la recherche de facteurs cancérogènes susceptibles d'expliquer l'association entre les concentrations en PM_{2,5} et la mortalité par cancer observée dans la cohorte de l'American Cancer Society (ACS) : « Bien que beaucoup d'incertitudes demeurent, il semble plausible que des cancérogènes chimiques connus soient responsables des cancers du poumon attribués à l'exposition à des PM_{2,5} dans l'étude de cohorte de l'ACS. Cependant, il serait possible que les particules soient à l'origine de ce cancer indépendamment de la présence de cancérogènes connus... Quelques particules peuvent contenir des quantités significatives de composés organiques ou de métaux qui pourraient contribuer à la cancérogénicité globale de la particule. Il a été suggéré que l'effet de ces cancérogènes était très faible voire indétectable. Aux concentrations environnementales (inférieures aux niveaux de surcharge), il est probable que la composition de la particule joue un rôle de plus en plus important dans les cancers induits par les particules. »

Au total, plusieurs hypothèses ont été évoquées sur l'origine du développement des tumeurs : (1) les composés organiques de la surface des particules interagissent avec l'ADN du tissu pulmonaire en formant des adduits à l'origine d'une cancérogenèse, mais ce mécanisme serait considéré comme mineur ; (2) l'exposition prolongée à une forte concentration de PED diminue l'épuration pulmonaire induisant de l'inflammation, une prolifération cellulaire, puis un cancer : ce modèle rend compte des tumeurs induites chez le rat ; (3) l'action initiatrice de composés organiques (adduit puis mutation) et l'action promotrice de l'inflammation et de la prolifération cellulaire sont responsables de la réponse tumorigène : cette hypothèse est basée sur la responsabilité

de la réponse inflammatoire tumorigène et sur les doutes, qu'on ne peut exclure, concernant la contribution des HAP cancérigènes.

Les PUF dominent les concentrations atmosphériques exprimées en surface spécifique et n'apportent qu'une contribution négligeable en masse. Ainsi, les PUF pourraient jouer un rôle central et encore mal évalué car, du fait de leur très petite taille, de leur grand nombre et de leur très grande surface spécifique par unité de masse, elles présentent une plus grande capacité d'adsorption des agents chimiques organiques et une capacité à pénétrer dans les cellules du tractus respiratoire. Des données abondantes existent sur les particules diesels (dans les études chez l'animal, le spectre granulométrique des PED serait compris entre 0,25 et 0,8 μm , d'après Oberdörster, 2002) mais le fonds documentaire liant les PUF aux HAP est très limité.

Bibliographie

- Adonis M, Gil L (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbon levels and mutagenicity of inhalable particulate matter in Santiago, Chile. *Inhal Toxicol* **12**, 1173-1183.
- Baulig A, Garlatti M, Bonvallot V, Marchand A, Barouki R, Marano F, Baeza-Squiban A (2003). Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L671-679.
- BIA (2003) Workshop "Ultra-fine aerosols at workplaces", BIA-Report 7/2003e.
- Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chevrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M, Marano F (1999). Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells *in vitro* and alter cytokine production. *Am J Physiol* **276**, L604-L613.
- Boland S, Bonvallot V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier M, Marano F (2000). Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**, L25-L32.
- Bond JA, Johnson NF, Snipes MB, Mauderly JL (1990a). DNA adduct formation in rat alveolar type II cells: cells potentially at risk for inhaled diesel exhaust. *Environ Mol Mutagen* **16**, 64-69.
- Bond JA, Mauderly JL, Wolff RK (1990b). Concentration- and time-dependent formation of DNA adducts in lungs of rats exposed to diesel exhaust. *Toxicology* **60**, 127-135.
- Bonvallot V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, Barouki R, Marano F (2001). Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**, 515-521.
- Borm PJ, Cakmak G, Jermann E, Weishaupt C, Kempers P, van Schooten FJ, Oberdorster G, Schins RP (2005). Formation of PAH-DNA adducts after *in vivo* and *in vitro* exposure of rats and lung cells to different commercial carbon blacks. *Toxicol Appl Pharmacol* **205**, 157-167.
- Burczynski ME, Lin HK, Penning TM (1999). Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Res* **59**, 607-614.

- Cass GR (1998). Organic molecular tracers for particulate air pollution sources. *Trend Anal Chem* **17**, 356-366.
- Cass GR, Hughes LA, Bhawe P, Kleeman MJ, Allen JO, Salmon LG (2000). The chemical composition of atmospheric ultra-fine particles. *Phil Trans R Soc Lond A* **358**, 2581-2592.
- Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultra-fine particle types. *Inhal Toxicol* **15**, 39-52.
- Don Porto Carero A, Hoet PH, Verschaeve L, Schoeters G, Nemery B (2001). Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol Mutagen* **37**, 155-163.
- Donaldson K, Stone V, Gilmour PS, Brown DM, MacNee W (2000). Ultra-fine particles: mechanisms of lung injury. *Phil Trans R Soc Lond A* **358**, 2741-2749.
- Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Pepelko W, Baggs RB, Oberdörster G (1996). Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* **136**, 372-380.
- Frampton MW (2001). Systemic and cardiovascular effects of airway injury and inflammation: ultrafine particle exposure in humans. *Environ Health Perspect* **109** (Suppl. 4), 529-32.
- Gallagher J, George M, Kohan M, Thompson C, Shank T, Lewtas J (1993). Detection and comparison of DNA adducts after *in vitro* and *in vivo* diesel emission exposures. *Environ Health Perspect* **99**, 225-228.
- Gallagher J, Heinrich U, George M, Hendee L, Phillips DH, Lewtas J (1994). Formation of DNA adducts in rat lung following chronic inhalation of diesel emissions, carbon black and titanium dioxide particles. *Carcinogenesis* **15**, 1291-1299.
- Gallagher J, Sams R 2nd, Inmon J, Gelein R, Elder A, Oberdorster G, Prahalad AK (2003). Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in rat lung DNA following subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* **190**, 224-231.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P (2005). Ultra-fine particles cross cellular membranes by non-phagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* **113**, 1555-1560.
- Gerde P, Muggenburg BA, Lundborg M, Dahl AR (2001a). The rapid alveolar absorption of diesel soot-adsorbed benzo[a]pyrene: bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-borne carcinogen. *Carcinogenesis* **22**, 741-749.
- Gerde P, Muggenburg BA, Lundborg M, Tesfaigzi Y, Dahl AR (2001b). Respiratory epithelial penetration and clearance of particle-borne benzo(a)pyrene. Health Effects Institute, Number 101, April 2001, 40 pp.
- Gilmour PS, Ziesenis A, Morrison ER, Vickers MA, Drost EM, Ford I, Karg E, Mossa C, Schroepel A, Ferron GA, Heyder J, Greaves M, MacNee W, Donaldson K (2004). Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultra-fine carbon black particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 35-44.
- Granum B, Lovik M (2002). The effect of particles on allergic immune responses. *Toxicol Sci* **65**, 7-17.
- Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Krishna Murthy GG, González-Flecha B (2002). Rapid Increases in the Steady-State Concentration of Reactive Oxygen Species in the Lungs and Heart after Particulate Air Pollution Inhalation. *Environ Health Perspect* **110**, 749-755.

- Harrison RM, Yin J (2000). Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci Total Environ.* **249**, 85-101.
- Harrison RM, Smith DJ, Kibble AJ (2004). What is responsible for the carcinogenicity of PM_{2.5}? *Occup Environ Med* **61**, 799-805.
- HEI (2002). Aust AE, Ball JC, Hu AA, Lighty JAS, Smith KR, Straccia AM, Veranth JM, Young WC. *Particle Characteristics Responsible for Effects on Human Lung Epithelial Cells*. HEI Research report N° **110**, 86 pages.
- Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE (1999). Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* **163**, 5582-5591.
- Hiura TS, Li N, Kaplan R, Horwitz M, Seagrave JC, Nel AE (2000). The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. *J Immunol* **165**, 2703-2711.
- IARC (1983). Polynuclear aromatic compounds, Part 1. Chemical environmental and experimental data. IARC Monogr 32, 33-68.
- IARC (1985). Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Bitumens, coal-tars and derived products, shale oils and soots. Monograph 35. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- IARC (1996). Printing processes and printing inks, carbon black and some nitro compounds. Monograph 65. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- ILSI [No authors listed] (2000). The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhal Toxicol* **12**, 1-17.
- IPCS (1998). Environnemental Health Criteria 202 : selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Ishiguro T, Takatori Y, Akihama K (1997). Microstructure of diesel soot particles probed by electron microscopy: First observation of inner core and outer shell. *Combust Flame* **108**, 231-234.
- Kittelson DB (1998). Engine and nanoparticles. A review. *J Aerosol Sci* **29(5-6)** 575-588.
- Kumagai Y, Arimoto T, Shinyashiki M, Shimojo N, Nakai Y, Yoshikawa T, Sagai M (1997). Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust particle components with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage. *Free Radic Biol Med* **22**, 479-487.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A (2003). Ultra-fine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* **111**, 455-460.
- Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM, Nel AE (2002). Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol* **169**, 4531-4541.
- Lindenschmidt RC, Witschi HP (1990). Toxicological interactions in the pathogenesis of lung injury. In: RS Goldstein, WR Hewitt and JB Hook (Eds), *Toxic Interactions*, Academic Press, New York, pp. 409-442.
- Mauderly JL, Snipes MB, Barr EB, Belinsky SA, Bond JA, Brooks AL, Chang I, Cheng YS, Gillett NA, Griffith WC, Henderson RF, Mitchell CE, Nikula KJ, Thomassen DG (1994). Part 1: Comparison of the carcinogenicity of Diesel exhaust and carbon black in rat lungs. Health Effects Institute, Synopsys Research Report Number 68.

- May WE, Benner BA, Wise SA, Schuetzle D, Lewtas J (1992). Standard reference materials for chemical and biological studies of complex environmental samples. *Mut Res* **276**, 11-22.
- Morawska L, Moore MR, Ristovski ZD (2004). Health impacts of ultra-fine particles: desktop literature review and analysis. Australian Government, Department of the Environment and Heritage; 311 pages. Commonwealth of Australia.
- Nel AE, Diaz-Sanchez D, Li N (2001). The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Curr Opin Pulm Med* **7**, 20-26.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**, 411-4.
- Nikula KJ (2000). Rat lung tumors induced by exposure to selected poorly soluble nonfibrous particles. *Inhal Toxicol* **12**, 97-119.
- Oberdörster G (2002). Toxicokinetics and effects of fibrous and non fibrous particles. *Inhal Toxicol* **14**, 29-56.
- OMS (1996). Diesel fuel and exhaust emissions. Environmental Health Criteria 171, Geneva, World Health Organization.
- Ono-Ogasawara M, Smith TJ (2004). Diesel exhaust particles in the work environment and their analysis. *Ind Health*. **42**, 389-399.
- Penn A, Murphy G, Barker S, Henk W, Penn L (2005). Combustion-derived ultra-fine particles transport organic toxicants to target respiratory cells. *Environ Health Perspect* **113**, 956-963.
- Pitts JN Jr, Sweetman JA, Harger W, Fitz DR, Paur HR, Winer AM (1985). Diurnal mutagenicity of airborne particulate organic matter adjacent to a heavily traveled West Los Angeles freeway. *J Air Pollut Control Assoc.* **35**, 638-43.
- Randerath K, Putnam KL, Mauderly JL, Williams PL, Randerath E (1995). An investigation of DNA damage in the lungs of rats exposed to diesel exhaust. Health Effects Institute, Synopsis Research Report Number 68, Part II.
- Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL (2000). Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med* **343**, 1742-9.
- Schlesinger RB (1995). Interaction of gaseous and particulate pollutants in the respiratory tract: mechanisms and modulators. *Toxicology*. **105**, 315-325.
- Sorensen M, Autrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, Knudsen LE, Loft S (2003). Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res* **544**, 255-271.
- Sun JD, Wolff RK, Kanapilly GM, McClellan RO (1984). Lung retention and metabolic fate of inhaled benzo(a)pyrene associated with diesel exhaust particles. *Toxicol Appl Pharmacol.* **73**, 48-59.
- Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Inoue K, Yoshida S, Takeda K, Yoshino S, Yoshikawa T, Morita M (2002). Lung expression of cytochrome P450 1A1 as a possible biomarker of exposure to diesel exhaust particles. *Arch Toxicol* **76**, 146-151.
- Tobias HJ, Beving DE, Ziemann PJ, Sakurai H, Zuk M, McMurry PH, Zarling D, Waytulonis R, Kittelson DB (2001). Chemical analysis of diesel engine nanoparticles using a nano-DMA/thermal desorption particle beam mass spectrometer. *Environ Sci Technol.* **35**, 2233-2243.
- Tokiwa H, Sera N, Nakanishi Y, Sagai M (1999). 8-Hydroxyguanosine formed in human lung tissues and the association with diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med* **27**, 1251-1258.

- Tuhackova J, Cajthaml T, Novak K, Novotny C, Mertelik J, Sasek V (2001). Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environ Pollut.* **113**, 255-262.
- Utell MJ, Frampton MW (2000). Acute health effects of ambient air pollution: the ultrafine particle hypothesis. *J Aerosol Med* **13**, 355-359.
- Venkataraman C, Raymond J (1998). Estimating the lung deposition of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons associated with multimodal urban aerosols. *Inhal Toxicol* **10**, 183-204.
- WHO (1996). *Diesel fuel and exhaust emissions*. Rosner G. (coord.), World Health Organization, Geneva.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* **14**, 473-486.
- Wolff RK, Bond JA, Sun JD, Henderson RF, Harkema JR, Griffith WC, Mauderly JL, McClellan RO (1989). Effects of adsorption of benzo[a]pyrene onto carbon black particles on levels of DNA adducts in lungs of rats exposed by inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol* **97**, 289-299.
- Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A (2004). Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultra-fine particle toxicity. *Environ Health Perspect* **112**, 1347-1358.
- Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE (2003). Use of Proteomics to Demonstrate a Hierarchical Oxidative Stress Response to Diesel Exhaust Particle Chemicals in a Macrophage Cell Line. *J Biol Chem* **278**, 50781-50790.
- Yanagisawa R, Takano H, Inoue K, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yamaki K, Kumagai Y, Uchiyama K, Yoshikawa T, Morita M (2003). Enhancement of acute lung injury related to bacterial endotoxin by components of diesel exhaust particles. *Thorax* **58**, 605-612.

3. Part des métaux dans la toxicité des particules

D. Lison

La compréhension des déterminants de la toxicité des particules en général, et des PUF en particulier, demeure très fragmentaire. Parmi les différentes hypothèses avancées et partiellement validées, on peut schématiquement regrouper deux modes d'action : (1) la libération à partir de la surface des particules de constituants biologiquement actifs (métaux, radicaux libres...) ou de polluants adsorbés (hydrocarbures aromatiques polycycliques, gaz irritants, endotoxines...) et/ou (2) la fixation, à la surface des particules, de certains composés endogènes (fer, protéines...) qui, dans ce micro-environnement, peuvent déclencher une réaction inflammatoire. Citons, comme exemples de molécules susceptibles de se lier à la surface des particules, le Fe (Shen et coll., 2000), ou le fragment c3 du complément (Saint-Remy et Cole, 1980). Pour ce qui concerne les PUF, eu égard à leur grande surface spécifique (jusque plusieurs centaines de m²/g), il est évident que ces deux types de phénomènes sont susceptibles de se

manifester avec ampleur puisque la surface d'échanges entre la particule solide et le milieu biologique liquide est énorme.

Est examiné ici le rôle que peuvent jouer les métaux dans la toxicité des particules en général et des PUF en particulier, lorsque des informations sont disponibles pour ces dernières. Les éléments métalliques peuvent exercer une toxicité locale (à l'endroit de contact avec l'organisme : par exemple la peau ou le poumon) ou une action systémique (à distance du point de pénétration : par exemple, le cadmium inhalé exerce une action toxique au niveau des os et des reins). Dans les deux cas, le processus est associé à, ou dépend, le plus souvent, de la solubilisation de l'élément métallique, qui se présente alors sous une forme ionique dans le milieu biologique.

Les métaux de transition (fer, cobalt, nickel, cuivre, manganèse, molybdène...) constituent une famille d'éléments compris entre les colonnes 2 et 13 du tableau périodique de Mendeleïev et possèdent une couche orbitale *d* incomplètement saturée en électrons. Il en résulte des propriétés physicochimiques particulières, notamment une capacité à former des complexes de coordination avec des molécules comportant des atomes électronégatifs comme l'oxygène ou l'azote (par exemple un chélateur comme l'EDTA), mais également de se lier à l'oxygène moléculaire pour le réduire et former des espèces réactives (ou activées) de l'oxygène (EAO). La formation d'EAO constitue une hypothèse mécanistique qui a reçu beaucoup d'intérêt au cours des vingt dernières années pour tenter d'expliquer la toxicité de certaines particules minérales, notamment la silice cristalline et les fibres d'amiante (Fubini et coll., 1990). On a, en effet, pu mettre en évidence que, d'une part, certaines particules produisent des EAO à l'interface solide-liquide (Pézerat et coll., 1989 ; Fubini et coll., 1990 ; Vallyathan et coll., 1988) et que, d'autre part, l'interaction des particules avec les cellules inflammatoires induisait une production locale d'EAO (*respiratory burst* ; Elferink et Ebbenhout, 1988 ; Donaldson et coll., 1988 ; Hedenborg et Klockars, 1989) ainsi que de radicaux azotés (Martin et coll., 1997). Le rôle des radicaux libres et du stress oxydatif dans la toxicité des particules est discuté *in extenso* au chapitre 7. Concernant l'intervention des espèces métalliques, il est important de se rappeler que le couple Fe(II)/Fe(III) participe aux réactions d'Haber-Weiss et de Fenton, qui génèrent différentes formes d'EAO parmi lesquelles l'anion superoxyde et le radical hydroxyle. Beaucoup d'autres métaux de transition (Co, Ni, Cr, V, Mn) ont des activités semblables, qui rendent en partie compte de leur toxicité locale (par exemple cancer bronchique associé à une exposition excessive au Ni ou au Cr ; Kasprzak, 2002) ou systémique (par exemple dégénérescence des noyaux striés et du pallidum associée à une exposition excessive au Mn ; Olanow, 2004).

Une des démonstrations les plus convaincantes du rôle des métaux de transition solubles dans la toxicité des particules inhalées provient d'une étude effectuée chez le rat à l'aide de cendres volantes d'huiles résiduelles (ROFA). Les auteurs ont très clairement montré que les effets toxiques induits par ces particules étaient supprimés lorsque

celles-ci étaient lavées dans une solution aqueuse, et reproduits par la solution de lavage qui contenait différents métaux de transition, dont le Fe, le Ni et le V étaient les principaux. Le traitement de cette solution à l'aide d'un chélateur supprimait son activité toxique (Dreher et coll., 1997 ; McNeilly et coll., 2005, pour des fumées de soudage).

Une étude similaire consacrée aux fumées de soudage provenant de matériaux à base de nickel ou de cobalt, riches en PUF, a montré *in vitro* que l'activité pro-inflammatoire de ces particules (libération d'interleukine-8 par, et stress oxydatif dans, une lignée de cellules pulmonaires humaines, A549) pouvait être reproduite par la fraction soluble extraite de ces particules, notamment par sa composante Ni. Les particules lavées et l'extrait aqueux traité avec un chélateur (chelex) voyaient leur activité réduite, confirmant le rôle de ces espèces métalliques (McNeilly et coll., 2004, 2005).

Il a également été montré que les espèces métalliques constitutives de ROFA étaient capables de causer des lésions génotoxiques, telles des adduits 8-hydroxydéoxyguanosine à l'ADN, qui signent un dommage oxydatif (Pralad et coll., 2001).

Le rôle des espèces métalliques dans la toxicité des particules environnementales de type PM₁₀ et PM_{2,5} a reçu beaucoup d'attention au cours des dix dernières années, notamment en raison du lien existant entre la présence de métaux de transition au sein de ces particules et leur capacité à induire *in vitro* et *in vivo* un stress oxydatif et, en aval, une série de réponses cellulaires (activation de NF-κB, Mitogen Activated Protein Kinases ou MAPK...) et de lésions génotoxiques (adduits 8-hydroxydéoxyguanosine) qui sont impliquées dans les processus inflammatoires et de cancérogenèse (Donaldson et coll., 2003). Il existe, en effet, une série d'arguments expérimentaux indiquant que la fraction soluble extraite *in vitro* de ces particules, qui contient différents métaux de transition dont principalement le Fe, est responsable, au moins en partie, de leur toxicité. Ainsi, on a montré qu'un extrait aqueux obtenu à partir de particules environnementales collectées dans la vallée de l'Utah exerçait une activité toxique *in vitro* (cellules épithéliales pulmonaires) et *in vivo* (administration intratrachéale chez le rat). Cette activité était réduite lorsque l'extrait était préalablement traité à l'aide d'une résine chélatrice (chelex) afin d'en soustraire les métaux (Molinelli et coll., 2002). Une étude similaire, menée toujours aux États-Unis avec les mêmes particules PM₁₀, a conclu que les composants métalliques solubles relargués à partir de ces particules rendaient compte d'une partie seulement de leurs effets toxiques *in vitro* et *in vivo* (Soukup et coll., 2000). Il a été suggéré que la perturbation de l'homéostasie du fer provoquée par les particules ambiantes était l'un des mécanismes initiateurs de leurs effets biologiques au niveau pulmonaire (Ghio et Cohen, 2005).

Il a également été montré que tant la fraction soluble que la fraction insoluble de particules environnementales de type PM₁₀ étaient biologiquement actives, et pouvaient catalyser la formation d'EAO (Ghio et coll., 1999 ; Soukup et coll., 2000). Une étude

menée sur différents échantillons de particules de fumées de soudage a également conclu que la toxicité de ces particules n'était pas uniquement dépendante de la fraction métallique soluble et requérait, pour certains échantillons, la présence combinée des fractions solubles et insolubles (Taylor et coll., 2003). Ceci pourrait en partie s'expliquer par le fait que la fraction soluble obtenue en laboratoire ne reflète pas fidèlement la fraction mobilisée *in vivo*, notamment au niveau des phagocytes et de leurs lysosomes, qui sont acides (pH ~ 4,6) et donc susceptibles de solubiliser avec une plus grande efficacité une série d'espèces métalliques (Gilmour et coll., 1996).

Il semble donc logique de postuler que seules les fractions solubilisées à partir des particules, ou disponibles à leur surface, participent à l'activité biologique. Le contenu total en métaux n'est probablement pas un bon indicateur de la toxicité, car l'ensemble n'est pas biodisponible. Ainsi, des tests de toxicité réalisés *in vitro* avec des particules environnementales PM_{2,5} prélevées en différents endroits de Paris ont indiqué qu'il n'existait pas de relation entre la composition en métaux totaux et les réponses biologiques enregistrées (Baulig et coll., 2004).

Toutefois, il serait trop simple d'imaginer que la toxicité des particules se résume exclusivement à l'activité de métaux de transition. Le rôle de ces derniers varie selon le type de particule envisagé. Ainsi, Knaapen et coll. (2002) ont rapporté que l'activité biologique (production de EAO, formation d'adduits 8-hydroxydéoxyguanosine) de particules environnementales n'était pas complètement expliquée par la fraction hydrosoluble libérée par ces particules. Même pour des particules riches en éléments métalliques comme les ROFA, des auteurs américains ont rapporté que la toxicité de ces particules ne pouvait pas être expliquée exclusivement par leur contenu en espèces métalliques solubles (Lewis et coll., 2003).

S'il est logique que les espèces métalliques contribuent à la toxicité de particules riches en métaux comme les ROFA ou les fumées de soudage, il n'en va pas de même pour d'autres particules. Ainsi, Brown et coll. (2000) ont montré *in vitro* et *in vivo* que la toxicité de PUF de noir de carbone (diamètre moyen 14 nm) n'était pas dépendante de la présence de métaux de transition solubilisés à partir des particules ou liés à la surface de celles-ci. Ceci n'est pas étonnant puisqu'il n'y a *a priori* guère de raison de soupçonner que de telles particules contiennent des métaux de transition. Ils ont montré plus tard que l'addition d'ions de Cu(II), Fe(II) ou Fe(III) à ces mêmes particules de noir de carbone augmentait leur capacité de produire des radicaux libres *in vitro* dans un système acellulaire. L'addition d'ions de Fe(III) augmentait également la réponse inflammatoire induite dans le poumon de rats instillés avec ces particules (Wilson et coll., 2002). Ces deux dernières observations, si elles indiquent que les ions Fe sont capables d'augmenter la toxicité des PUF, ne démontrent cependant pas que ce processus soit impliqué dans la toxicité des particules elles-mêmes.

On peut toutefois imaginer que, comme cela a été mis en évidence pour les fibres d'amiante (Fubini et Mollo, 1995), du Fe endogène se fixe sur les particules déposées dans les voies aériennes et y contribue à exercer un stress oxydatif. Un tel effet a été démontré chez le rat traité par instillation intratrachéale de particules d'échappement de moteur diesel (PED). On observait dans le poumon des animaux traités une élévation du Fe non-hémique (indépendant des globules rouges), associé à l'apparition d'une réaction inflammatoire et d'une chute des taux d'ascorbate dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (suggérant un stress oxydatif ; Ghio et coll., 1999). On sait également que des particules d'oxydes minéraux (silice, silicate, rutile...) possèdent des quantités mesurables de Fe complexé à leur surface ; on observe une très bonne corrélation entre cette quantité de Fe et l'activité toxique de ces particules *in vitro* et *in vivo* (Ghio et coll., 1996).

La présence d'éléments métalliques au sein des particules n'est certainement pas le seul élément qui puisse rendre compte de leur toxicité. Ainsi, Schins et coll. (2004) ont examiné le potentiel toxique de particules environnementales de différentes tailles ($< 2,5 \mu\text{m}$ ou $2,5\text{-}10 \mu\text{m}$) et provenant de régions différentes en Allemagne (rurale ou urbaine). Après instillation intratrachéale chez le rat, ils ont apprécié l'inflammation pulmonaire en mesurant divers marqueurs biochimiques dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire. La réactivité biologique des particules n'était pas corrélée avec leur contenu en métaux solubles (Fe, Cu, V, Ni, Cr ou Al) mais plutôt avec la présence d'endotoxine.

D'autres auteurs ont utilisé une approche toxicogénomique pour rechercher dans quelle mesure le profil d'expression génique induit par des particules environnementales complexes (ROFA) pouvait être reproduit par leurs constituants métalliques principaux (Ni et V) dans le poumon de rat. Même si quelques similitudes étaient observées, on ne pouvait pas conclure que les éléments métalliques rendaient compte du profil observé après traitement par les ROFA (Nadadur et Kodavanti, 2002).

En conclusion, il semble que l'on doive retenir l'idée que, lorsque des particules contiennent des espèces métalliques biodisponibles (solubles, présentes ou déposées en surface), celles-ci peuvent participer à l'activité toxique de ces particules. Une règle universelle ne peut cependant pas être dégagée et un examen individualisé de chaque type de particule reste indispensable pour bien appréhender les déterminants de la toxicité. La très grande majorité des informations rapportées ci-dessus se rapporte à des particules de taille supérieure à 100 nm ; il reste à établir si ces connaissances sont extrapolables au domaine des particules ultra-fines, pour lesquelles très peu de données spécifiques sont disponibles.

Bibliographie

- Baulig A, Poirault JJ, Ausset P, Schins R, Shi T, Baralle D, Dorlhene P, Meyer M, Lefevre R, Baeza-Squiban A, Marano F (2004). Physicochemical characteristics and biological activities of seasonal atmospheric particulate matter sampling in two locations of Paris. *Environ Sci Technol* **38**, 5985-5992.
- Brown DM, Stone V, Findlay , MacNee W, Donaldson K (2000). Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med* **57**, 685-691.
- Donaldson K, Slight J, Bolton RE (1988). Oxidant production by control and inflammatory bronchoalveolar leukocyte populations treated with mineral dusts *in vitro*. *Inflammation* **12**, 231-243.
- Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic Biol Med* **34**, 1369-1382.
- Dreher KL, Jaskot RH, Lehmann JR, Richards JH, McGee JK, Ghio AJ, Costa DL (1997). Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J Toxicol Environ Health* **50**, 285-305.
- Elferink JG, Ebbenhout JL (1988). Asbestos-induced activation of the respiratory burst in rabbit neutrophils. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **61**, 201-211.
- Fubini B, Giamello E, Volante M, Bolis V (1990). Chemical functionalities at the silica surface determining its reactivity when inhaled. Formation and reactivity of surface radicals. *Toxicol Ind Health* **6**, 571-598.
- Fubini B, Mollo L (1995). Role of iron in the reactivity of mineral fibers. *Toxicol Lett* **82-83**, 951-960.
- Ghio AJ, Cohen MD (2005). Disruption of iron homeostasis as a mechanism of biologic effect by ambient air pollution particles. *Inhal Toxicol* **17** 709-716.
- Ghio AJ, Pritchard RJ, Lehmann JR, Winsett DW, Hatch GE (1996). Lung inflammation after exposure to nonfibrous silicates increases with chelatable [Fe3+]. *J Toxicol Environ Health* **49**, 11-28.
- Ghio AJ, Stonehuerner J, Dailey LA, Carter JD (1999). Metals associated with both the water-soluble and insoluble fractions of an ambient air pollution particle catalyze an oxidative stress. *Inhal Toxicol* **11**, 37-49.
- Gilmour PS, Brown DM, Lindsay TG, Beswick PH, MacNee W, Donaldson K (1996). Adverse health effects of PM10 particles, involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup Environ Med* **53**, 817-822.
- Hedenborg M, Klockars M (1989). Quartz-dust-induced production of reactive oxygen metabolites by human granulocytes. *Lung* **167**, 23-32.
- Kasprzak KS (2002). Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **32**, 958-967.
- Knaapen AM, Shi T, Borm PJ, Schins RP (2002). Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem* **234-235**, 317-326.

- Lewis AB, Taylor MD, Roberts JR, Leonard SS, Shi X, Antonini JM (2003). Role of metal-induced reactive oxygen species generation in lung responses caused by residual oil fly ash. *J Biosci* **28**, 13-18.
- Martin LD, Krunkosky TM, Dye JA, Fischer BM, Jiang NF, Rochelle LG, Akley NJ, Dreher KL, Adler KB (1997). The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environ Health Perspect* **105** (Suppl. 5), 1301-1307.
- McNeilly JD, Heal MR, Beverland IJ, Howe A, Gibson MD, Hibbs LR, MacNee W, Donaldson K (2004). Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* **196**, 95-107.
- McNeilly JD, Jimenez LA, Clay MF, MacNee W, Howe A, Heal MR, Beverland IJ, Donaldson K (2005). Soluble transition metals in welding fumes cause inflammation via activation of NF-kappaB and AP-1. *Toxicol Lett* **158** 152-157.
- Molinelli AR, Madden MC, McGee JK, Stonehuerner JG, Ghio AJ (2002). Effect of metal removal on the toxicity of airborne particulate matter from the Utah Valley. *Inhal Toxicol* **14**, 1069-1086.
- Nadadur SS, Kodavanti UP (2002). Altered gene expression profiles of rat lung in response to an emission particulate and its metal constituents. *J Toxicol Environ Health A* **65**, 1333-1350.
- Olanow CW (2004). Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* **1012**, 209-223.
- Pézerat H, Zalma R, Guignard J, Jaurand MC (1989). Production of oxygen radicals by the reduction of oxygen arising from the surface activity of mineral fibres. *IARC Sci Publ* 100-111.
- Prahalad AK, Inmon J, Dailey LA, Madden MC, Ghio AJ, Gallagher JE (2001). Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity. *Chem Res Toxicol* **14**, 879-887.
- Saint-Remy JM, Cole P (1980). Interactions of chrysotile asbestos fibres with the complement system. *Immunology* **41**, 431-437.
- Schins RP, Lightbody JH, Borm PJ, Shi T, Donaldson K, Stone V (2004). Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 1-11.
- Shen Z, Bosbach D, Hochella MF Jr., Bish DL, Williams MG Jr, Dodson RF, Aust AE (2000). Using *in vitro* iron deposition on asbestos to model asbestos bodies formed in human lung. *Chem Res Toxicol* **13**, 913-921.
- Soukup JM, Ghio AJ, Becker S (2000). Soluble components of Utah Valley particulate pollution alter alveolar macrophage function *in vivo* and *in vitro*. *Inhal Toxicol* **12**, 401-414.
- Taylor MD, Roberts JR, Leonard SS, Shi X, Antonini JM (2003). Effects of welding fumes of differing composition and solubility on free radical production and acute lung injury and inflammation in rats. *Toxicol Sci* **75**, 181-191.
- Vallyathan V, Shi XL, Dalal NS, Irr W, Castranova V (1988). Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis* **138**, 1213-1219.
- Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V (2002). Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* **184**, 172-179.

4. Nature de la substance

B. Hervé-Bazin

D'anciens travaux, la plupart cités par ailleurs dans cet ouvrage, ont montré l'importance de la nature chimique de la particule fine ou ultra-fine dans la réponse pulmonaire (inhalation, instillation, *in vitro*). Le tableau qui suit (tableau 8.I) en donne un aperçu partiel.

PUF comparées et conditions d'expérimentation	Aperçu des principaux résultats	Référence
CB (20 nm), TiO ₂ (20 nm ou < 200 nm). Instillations intratrachéales (rats)	L'interstitialisation est plus marquée pour TiO ₂ (env. 50 %) qu'avec CB (env. 4 %)	Oberdörster et coll., 1992
ZnO, MgO. Exposition par inhalation de volontaires sains et examens différés du LLBA	MgO ne produit pas de réactions inflammatoires, contrairement à ZnO	Kuschner et coll., 1995, 1997a (ZnO), 1997b (MgO)
PED, CB, SiO ₂ . 1 mg par instillation intratrachéale et analyse du LLBA	Effets sur la perméabilité de l'épithélium pulmonaire de très marqués et durables à faibles et passagers selon les particules	Murphy et coll., 1998
Ni, Co, TiO ₂ , SiO ₂ , instillation intratrachéale, 1 mg, rat. Analyse du LLBA	Ni provoquait les réactions les plus marquées, suivi du quartz et du Co ; TiO ₂ était le moins actif	Zhang et coll., 1998
CB, Co, Ni, TiO ₂ , instillation intratrachéale, 125 µg ; analyse du LLBA (PMN)	Différences dans l'intensité et la temporalité des réponses, TiO ₂ n'induisant pas une réponse significative	Dick et coll., 2003
Diverses tailles de particules de la pollution environnementale, <i>in vitro</i> sur cellules épithéliales bronchiques humaines	Les réponses (production de cytokines) dépendent du contenu en métaux et/ou en constituants organiques	Huang et coll., 2003

Tableau 8.I. Aperçu partiel de travaux ayant constaté l'importance de la composition de la particule dans la réponse biologique.

Sur ce thème, le choix a été fait ici de reproduire ci-après quelques passages (en italiques) d'une synthèse plus récente du Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR, 2005, pp. 22-23, 26), sans reprendre une recherche

systematique des publications antérieures dans ce domaine. Quelques publications ultérieures à ce travail ont été ensuite analysées pour actualiser cette mise au point.

« *La composition chimique et les propriétés toxicologiques intrinsèques de la substance jouent un rôle important dans la toxicité des particules (Donaldson et coll., 2004). Renwick et coll. (2004) ont montré que les effets chez le rat des noirs de carbone sont plus marqués que ceux du dioxyde de titane, alors que ces deux sortes de particules induisent, plus fortement que des particules plus grosses, inflammation pulmonaire et atteintes épithéliales. Par ailleurs, la réactivité de la particule peut être modifiée par des substances adsorbées. Xia et coll. (2004) ont montré que des fractions extraites de polluants particuliers environnementaux (particules diesels) exercent des effets toxiques sur cellules in vitro. Les PUF de l'air ambiant peuvent avoir une composition très complexe, dont les constituants, par exemple substances organiques et éléments métalliques, peuvent interagir. On a montré que le fer est capable de potentialiser les effets de PUF de carbone, accroissant leur réactivité et le stress oxydant (Wilson et coll., 2002). Cependant, la modification de la surface de la particule peut aussi réduire sa cytotoxicité. La cytotoxicité in vitro de nanoparticules d'oxyde de fer super-paramagnétique a pu être supprimée en les recouvrant de pullulan (Gupta et Gupta, 2005). On a également noté la diminution de la cytotoxicité in vitro de nanoparticules d'oxyde de fer modifiées par du dextrane et de l'albumine (Berry et coll., 2003). »*

Note. Le pullulan est un polysaccharide peu toxique produit par la levure *Aureobasidium Pullulan*. Hydrolysé par la « pullulanase », il donne essentiellement du maltotriose. Depuis plus de 20 ans, il est utilisé au Japon comme ingrédient alimentaire. Aux États-Unis, il a le statut « GRAS » (*Generally Regarded As Safe*, généralement considéré comme inoffensif) pour un large éventail d'applications.

« *Parmi diverses PUF (PVC, TiO_2 , SiO_2 , Co, Ni), seul le Co s'est montré cytotoxique envers des cellules endothéliales, avec production de la cytokine pro-inflammatoire IL8 (Peters et coll., 2004) ; seuls TiO_2 et SiO_2 ont également provoqué l'expression de IL8, respectivement mineure et marquée. Les auteurs n'ont pas proposé d'explication à ces différences, mais elles pourraient provenir des natures chimiques et/ou des tailles, ces dernières allant d'un diamètre moyen de 14 nm jusqu'à 120 nm, des agglomérats atteignant même 420 nm (Peters et coll., 2004). La distribution in vivo de particules microniques dépendait de leur composition : des particules de poly(méthacrylate de méthyle) ont été retrouvées dans la rate après injection intrapéritonéale, mais pas celles de polystyrène (Tomazic-Jezic et coll., 2001), qui s'étaient accumulées principalement dans les tissus adipeux de la cavité péritonéale, mais étaient très peu présentes dans la rate. »*

« *Si le fait de savoir que des nanoparticules proviennent de l'environnement constitue une indication de leur toxicité, il convient de ne pas oublier que celles formées par*

combustion sont recouvertes de toutes sortes de substances réactives, y compris d'origine biologique comme les endotoxines (Carty et coll., 2003 ; Kreyling et coll. 2004 ; Schins et coll., 2004). Pour ces particules, il faut donc prendre en compte la possible influence de la composition et des contaminations. »

« En dehors de la taille, la nature chimique exerce son propre impact sur l'inflammation pulmonaire, des PUF de Ni se montrant plus toxiques que des PUF de Co, et celles de TiO₂ se révélant les moins toxiques (Zhang et coll., 1998). Le classement par toxicité était fondé sur la capacité des matériaux à induire des dommages à l'ADN plasmidique par action de radicaux libres, mécanisme qui pourrait sous-tendre les différences observées. »

Apport de publications plus récentes

Ovrevik et coll. (2005) ont montré que l'expression de chimiokines (MIP-2, IL-8) par des cellules épithéliales de poumon humain (A549) ou d'origine murine, exposées à des particules minérales grossières (< 10 µm) ou fines (< 2,5 µm) tirées de carrières, dépendait de la composition du minéral. Par exemple, le contenu en plagioclase (un type d'aluminosilicate) avait un fort effet négatif sur l'expression de MIP-2, et le pyroxène (autre type de silicate, riche en fer et magnésium), un effet positif. Toutefois, ils estimaient que les connaissances sont insuffisantes pour prédire les effets biologiques de ce genre de matériaux.

Ovrevik et Schwartze (2006) ont critiqué une publication de Risom et coll. (2005), dont le résumé stipulait : « Plusieurs études utilisant des particules modèles ou type, comme des noirs de carbone, suggèrent que la surface totale est le paramètre le plus déterminant de l'effet des PUF, alors que la composition chimique aurait plus d'importance pour des particules plus grossières. » Cette affirmation, écrivent Ovrevik et Schwarze, impliquerait que toutes les PUF de même taille auraient une toxicité similaire, indépendante de leur composition chimique, en contradiction avec les principes de base de la toxicologie ; par ailleurs, elle n'est pas suffisamment étayée. Risom et coll. s'appuient en effet sur des publications de Renwick et coll., Gilmour et coll., et Schins et coll., portant sur les effets de particules fines et grossières de la pollution environnementale. On ne peut valablement comparer, selon Ovrevik et Schwarze, des particules modèles avec des aérosols aussi complexes et recelant des endotoxines ; de plus, Gilmour et coll. ont seulement comparé des PUF de noir de carbone de différentes tailles, ce qui ne permet pas d'en conclure quoi que ce soit sur l'importance de la composition chimique. Par ailleurs, si l'étude de Renwick et coll. a de fait inclus des PUF de TiO₂ et de noir de carbone, les expositions ont été faites à masse égale, la surface totale du noir de carbone représentant cinq fois celle du TiO₂, ce qui rend également difficiles des conclusions sur l'importance de la composition chimique. Une autre publication sur laquelle s'appuient Risom et coll. est celle de Saber et coll., comparant particules d'échappement diesel

(PED) et noir de carbone ultra-fin ; or Saber et coll. concluent au contraire que « des propriétés autres que la taille et la surface (...) doivent intervenir », ce qui, selon Ovrevik et Schwarze, suggère clairement que la composition chimique est un facteur important de la toxicité des PED. Ils citent par ailleurs, à l'appui de leur critique, deux publications, l'une de Yang et coll. (1999), l'autre de Hamoir et coll. (2003), lesquelles suggèrent un rôle à la composition chimique et à la réactivité de surface. Enfin, Ovrevik et Schwarze constatent que Risom et coll. n'ont pas pris en compte un ensemble d'études qui attribuent les effets des PED aux substances organiques adsorbées, telles que les HPA (voir points 1 et 2 précédents).

Sans répondre point par point à ces critiques, Loft et coll. (2006) affirment n'avoir jamais voulu signifier que la surface est l'unique déterminant des effets sur la santé des PUF, et qu'ils avaient centré leur examen sur les seules réactions d'inflammation pulmonaire.

Hussain et coll. (2005) ont étudié la toxicité *in vitro*, sur cellules de foie de rat BRL 3A, de nano- ou micro-particules de diverses espèces chimiques : Ag (15 ou 100 nm), MoO₃ (30 ou 150 nm), Al (30 ou 103 nm), Fe₃O₄ (30 ou 47 nm), et TiO₂ (40 nm), CdO (1 µm), MnO₂ (1-2 µm), W (27 µm). Le but était de comparer les réponses en fonction de la taille et de la composition ; ont été étudiés, après une exposition de 24 heures, la morphologie cellulaire, le fonctionnement des mitochondries (test au MTT, potentiel de membrane), l'intégrité de la membrane (dosage de la LDH), le niveau de glutathion réduit, les espèces activées de l'oxygène. Les particules d'argent se sont révélées nettement plus toxiques, MoO₃ modérément toxique, et les autres particules ne montraient qu'une toxicité modérée aux plus fortes doses (100-250 µg/ml). La cytotoxicité des PUF d'Ag semblait attribuable à un stress oxydant.

Revenant sur une précédente analyse « intuitive » de données dose-réponse relatives à la prévalence de cancers pulmonaires chez le rat exposé en chronique par instillation à six types de particules de faible solubilité, à faibles et fortes surfaces spécifiques (Borm et coll., 2004), Morfeld et coll. (2006) soulignent les points essentiels suivants, après une analyse plus rigoureuse des données :

- le recours aux paramètres surface ou volume des particules n'améliore pas le modèle dose-réponse par rapport à l'utilisation du paramètre masse, contrairement aux conclusions antérieures ;
- la prévalence des tumeurs reste cependant plus élevée (d'un facteur de l'ordre de 1,6) pour les particules de surfaces spécifiques élevées ;
- l'analyse est en faveur d'une dose-seuil pour l'induction du cancer pulmonaire (14 mg ; IC95 : 5,0-14,6 mg) ; elle indique également une « saturation » de la réponse (18 mg ; IC95 : 15,1-42,8) ;
- quelle que soit la métrique, le type de particules reste un facteur prédictif important de la prévalence des tumeurs.

Ce dernier point, qui vient en contradiction avec diverses publications rassemblant sur un graphique unique différents types de poussières, renvoie à l'utilisation courante en toxicologie expérimentale de matériaux « de référence », témoins soit négatifs (TiO₂ en général) soit positifs (une silice cristalline, souvent le quartz). Cette pratique, soutien de la validité des travaux, témoigne de l'importance de la nature de la substance du matériau dans la manifestation de certaines de ses propriétés, constat qui a fondé la toxicologie.

Une étude montre que les surfaces de minéraux en feuillets (par exemple talc, brucite, biotite, muscovite), naguère pensées comme plus ou moins équivalentes du point de vue de leur affinité pour des molécules d'ADN, diffèrent en réalité notablement. Cette affinité semble dépendre de la composition chimique et/ou de la structure cristallographique, et de leur impact sur le potentiel de surface (Antognozzi et coll., 2006).

La question des facteurs impliqués dans les réponses biologiques à la présence de particules différant soit par la taille, soit par la nature chimique, soit par d'autres caractéristiques (par exemple traitement de surface), extrêmement complexe, commence seulement à être étudiée de façon systématique (Refsnes et coll., 2006). La diversité des agents chimiques (des métaux de transition aux HAP en passant par les groupes chimiques superficiels), physiques (taille, forme, caractéristiques de surface) et des réponses biologiques considérés (biomolécules émises par une large diversité de types cellulaires, délais et modalités d'observation, travaux *in vitro* ou *in vivo*...) ne facilite pas une interprétation d'ensemble (Refsnes et coll., 2006 ; Karakoti et coll., 2006). Quoi qu'il en soit, en fonction des conditions expérimentales, plusieurs facteurs interviennent, indépendamment ou non, parmi lesquels la nature chimique est sans doute l'un des plus importants.

Bibliographie

- Antognozzi M, Wotherspoon A, Hayes JM, Miles MJ, Szczelkun MD, Valdrè G (2006). A chloride mineral surface actively drives the deposition of DNA molecules in stretched conformations. *Nanotechnology* **17**, 3897-3902.
- Borm P, Schins R, Albrecht C (2004). Inhaled particles and lung cancer, part B: Paradigms and risk assessment. *Internat J Cancer* **110**(1) 3-14.
- Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* **15**(1) 39-52.
- Gilmour PS, Ziesenis A, EMorrison ER, Vickers MA, Drost EM, Ford I, Karg E, Mossa C, Schroepel A, Ferron GA, Heyder J, Graves M, MacNee W, Donaldson K (2004). Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 35-44.
- Hamoir J, Nemmar A, Halloy D, Wirth D, Vincke G, Vanderplasschen A, Nemery B, Gustin P (2003). Effect of polystyrene particles on lung microvascular permeability in isolated perfused rabbit lungs: role of size and surface properties. *Toxicol Appl Pharmacol* **190**, 278-285.

- Huang SL, Hsu MK, Chan CC (2003). Effects of submicrometer particle compositions on cytokine production and lipid peroxidation of human bronchial epithelial cells. *Environ Health Perspect* **111**(4) 478-482.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ (2005). *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* **19**(7) 975-983.
- Karakoti AS, Hench LL, Seal S (2006). The Potential Toxicity of Nanomaterials—The Role of Surfaces. *J Occup Med* **58**(7) 77-82.
- Kuschner WG, D'Alessandro A, Wintermeyer SF, Wong H, Boushey HA, Blanc PD (1995). Pulmonary responses to purified zinc oxide fume. *J Investig Med* **43**(4) 371-378.
- Kuschner WG, d'Alessandro A, Wong H, Blanc PD (1997a). Early pulmonary cytokine responses to zinc oxide fume inhalation. *Environ Res* **75** (1) 7-11.
- Kuschner WG, Wong H, D'Alessandro A, Quinlan P, Blanc PD (1997b). Human pulmonary responses to experimental inhalation of high concentration fine and ultrafine magnesium oxide particles. *Environ Health Perspect* **105**(11) 1234-1237.
- Loft S, Risom L, Möller P (2006). Chemical composition and surface areas in relation to health effects of ultrafine particles—Reply to Ovreivik and Schwarze. *Mut Res* **594**(1-2) 199-200.
- Long JF, Waldman WJ, Kristovich R, Williams M, Knight D, Dutta PK (2005). Comparison of ultrastructural cytotoxic effects of carbon and carbon/iron particulates on human monocyte-derived macrophages. *Environ Health Perspect* **113**(2) 170-174.
- Morfeld P, Albrecht C, Drommer W, Borm PJA (2006). Dose-Response and Threshold Analysis of Tumor Prevalence after Intratracheal Instillation of Six Types of Low- and High-Surface-Area Particles in a Chronic Rat Experiment. *Inhalat Toxicol* **18**(4) 215-225.
- Murphy SA, Bérubé KA, Pooley FD, Richards RJ (1998). The response of lung epithelium to well characterised fine particles. *Life Sci* **62**(19) 1789-1799.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193-199.
- Ovreivik J, Myran T, Refsnes M, Lag M, Becher R, Hetland RB, Schwarze PE (2005). Mineral particles of varying composition induce differential chemokine release from epithelial lung cells: importance of physico-chemical characteristics. *Ann Occup Hyg* **49**(3) 219-231.
- Ovreivik J, Schwarze PE (2006). Chemical composition and not only total surface area is important for the effects of ultrafine particles. Correspondence. *Mut Res* **594**(1-2) 201-202.
- Refsnes M, Hetland RB, Øvreivik J, Sundfjør I, Schwarze PE, Låg M (2006). Different particle determinants induce apoptosis and cytokine release in primary alveolar macrophage cultures. *Particle Fibre Toxicol* **3**, 10.
- Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* **61**(5) 442-447.
- Risom L, Möller P, Loft S (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res*, doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012.
- SCENIHR (2005). Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Opinion on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. SCENIHR/002/05, adopted 29 September 2005 (78 pages).

Schins RPF, Lightbody JH, PBorm PJA, Shi T, Donaldson K, Stone V (2004). Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 1–11.

Yang HM, Barger MW, Castranova V, Ma JK, Yang YY, Ma JY (1999). Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbon black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: evidence of DEP suppression of macrophage activity. *J Toxicol Environ Health A* **58**, 261–278.

Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, Nakakuki K, Kohyama N, Donaldson K (1998). Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *J Toxicol Environ Health A* **53(6)** 423–438.

5. Particules microniques et particules ultra-fines du même matériau : quels changements ?

B. Hervé-Bazin

L'une des questions qui se posent lorsqu'on réfléchit aux dangers potentiels présentés par l'exposition à des PUF est la suivante : qu'est-ce qui change, pour un même matériau, quand on passe de particules micrométriques à des particules nanométriques ? Bien que cette question soit abordée sous plusieurs angles dans cet ouvrage, il a semblé utile de tenter de résumer les éléments de réponse sous forme de tableaux. N'y sont citées que des références caractéristiques.

Les évolutions des propriétés des matériaux dépendent à la fois des propriétés et des matériaux considérés : il est probable, par exemple, qu'un matériau siliceux conserve des sites silanols superficiels (même si leur densité par unité de surface tend à décroître), ou que le rôle d'un métal de transition superficiel biodisponible ne disparaîtra pas lors d'une diminution importante de la taille des particules (participation à la formation de radicaux libres). En revanche, les mécanismes d'internalisation cellulaire peuvent différer qualitativement (phagocytose contrariée, cavéoles, puits à clathrine, pinocytose, endocytose...) en fonction de la taille et des propriétés de surface ; par exemple, des particules peu solubles déposées dans le poumon profond y seront généralement éliminées par les macrophages alvéolaires ou subiront des translocations limitées (interstitialisation, translocation vers des ganglions locaux, la plèvre...) si elles sont micrométriques, mais pourront éventuellement être distribuées dans tout l'organisme (en fonction de leurs natures chimiques et propriétés de surface notamment) si leur taille devient nanométrique. Les propriétés qui semblent plus particulièrement spécifiques des nanoparticules sont, ci-après, signalées par un astérisque (*).

Les tableaux (tableaux 8.II à 8.V) qui suivent distinguent les phases toxicocinétiques (distribution et devenir dans l'organisme) et toxicodynamiques (effets locaux et effets à distance). Pour plus de lisibilité et réduire les répétitions, les références ont été regroupées après les tableaux.

5.1. Aspects toxicocinétiques

Observations	
Commentaires	Références (non exhaustif)
(*) Possibilité de pénétration percutanée	
Cette possibilité ne peut être exclue, notamment en cas de flexions répétées de la peau. La pénétration resterait faible, mais les données sont trop limitées pour conclure de façon définitive	De Jalón et coll., 2001 ; Tinkle et coll., 2002, 2003, 2004 ; Miyazaki et coll., 2003 ; Wasdo et coll. 2005
Le dépôt de PUF dans les voies respiratoires est supérieur à celui de particules de plus grande taille	
C'est encore plus vrai si l'on évalue le dépôt en nombre de particules ou en surface totale	Fletcher et coll., 2005 ; Zhang et coll., 2005
L'importance du dépôt est plus grande pour des asthmatiques ou insuffisants respiratoires, et en cas d'effort physique	Brown et coll., 2002 ; Chalupa et coll., 2004
(*) Pénétration du tissu pulmonaire (interstitialisation)	
Son importance dépend fortement de la taille et de la nature de la particule (différences $\text{TiO}_2\text{-CB}$, $\text{TiO}_2\text{-BaSO}_4$)	Oberdörster et coll., 1992 ; Cullen et coll., 2000 ; Carter et coll., 2004
Phagocytose par des cellules de l'épithélium respiratoire	
Accroît la persistance locale et donc la possibilité d'effets à long terme, locaux ou systémiques après passage dans l'organisme (notamment si forte insolubilité)	Watson et Brain, 1979 ; Ferin et coll., 1992 ; Churg et coll., 1998, 1999, 2005 ; Nikula et coll., 2001 ; Dai et coll., 2003

Tableau 8.II. Aperçu synthétique et non exhaustif des aspects toxicocinétiques de la pénétration/distribution des PUF dans l'organisme.

(*) Pénétration par les voies nerveuses (nerfs olfactif, rigéminé)	
Après dépôt dans les fosses nasales (MnO ₂ , 31 nm ; fullérènes en suspension aqueuse ; particules de ¹³ C)	Feikert et coll., 2004 ; Illum, 2004 ; Oberdörster E, 2004 ; Oberdörster G et coll., 2004
Pénétration dans différents types de cellules	
Peut s'effectuer autrement que par phagocytose ; (*) elle est suivie d'une localisation interne (réseau tubulaire, mitochondries, noyau...), ou d'une exocytose (trans-cytose). Elle est notamment fonction de la taille et de la surface de la particule.	Foster et coll., 2001 ; Kato et coll., 2003 ; Li et coll., 2003 ; Geiser et coll., 2005 ; Pantarotto et coll., 2004 ; Xia et coll., 2004 ; Maysinger et coll., 2006
(*) Distribution possible dans tout l'organisme (voies lymphatique, sanguine, nerveuse, paracellulaire...)	
En première approche, la nature de la particule, sa taille, et la dose déterminent l'importance de la translocation, et les propriétés de surface sa distribution.	Kreyling et coll., 2002 ; Nemmar et coll., 2002 ; Oberdörster et coll., 2002
Présence constatée dans de nombreux organes (foie, rate, cerveau...) de nanoparticules de natures variées.	Takenaka et coll., 2001 ; Wetterberg et coll., 2002 ; Gatti, 2004, 2005 ; Semmler et coll., 2004
Pénétration par voie digestive	
Soit après régurgitation de particules éliminées des voies pulmonaires, soit directement (adjuvants alimentaires). Un lien avec la maladie de Crohn est suspecté.	Lomer et coll., 2002 ; Gatti, 2004

Tableau 8.II. (suite) Aperçu synthétique et non exhaustif des aspects toxicocinétiques de la pénétration/distribution des PUF dans l'organisme.

5.2. Aspects toxicodynamiques

5.2.1. Effets locaux

Niveau cellulaire		
Observations		
	Commentaires	Références (non exhaustif)
(*) Perturbation du réseau microtubulaire		
	Effets sur la mobilité des macrophages et leurs capacités de phagocytose (nanoparticules de carbone, de TiO ₂ , PM _{2,5} ...).	Lundborg et coll., 2001, 2006 ; Calcabrini et coll., 2004 ; Renwick et coll., 2001, 2004 ; Möller et coll., 2002, 2005
(*) Localisations mitochondriales		
	Peuvent entraîner une apoptose	Li et coll., 2003 ; Xia et coll., 2004
(*) Localisation dans le noyau cellulaire		
	Conséquences ? (nanotubes de C fonctionnalisés)	Pantarotto et coll., 2004

Tableau 8.III. Aperçu synthétique et non exhaustif des effets toxicodynamiques des PUF dans l'organisme, au niveau cellulaire.

Niveau tissulaire		
Observations		
	Commentaire	Références (non exhaustif)
Dégénérescence des tissus tapissant les fosses nasales		
	Rôle possible conjoint de l'ozone, des aldéhydes, oxydes d'azote... (forte pollution urbaine)	Calderon-Garciduenas et coll., 2003
(*) Vasoconstriction artérielle		
	Élément possible du risque cardiovasculaire (ROFA, TiO ₂ , PM _{2,5}).	Nurkiewicz et coll., 2006 ; Rivero et coll., 2005 ; Sun et coll., 2005.
(*) À masse égale, les PUF sont plus toxiques au niveau pulmonaire que des particules plus grosses de même composition		
	Observation faite pour différentes substances et conditions (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>), pour différents indicateurs d'effets (recrutement cellulaire, protéines totales du LLBA, interleukines, etc.)	Oberdörster G et coll., 2005, 2004
Perturbations légères des fonctions respiratoires		
	Concerne les populations à risque (nouveau-nés et enfants, personnes âgées ou fragilisées). Environnement.	Brunekreef et Forsberg, 2005
(*) Renforcement ou induction de réactions allergiques		
	Voir notamment chapitre 6, point 2 et ses références	
Cancer pulmonaire		
	Soupçonné en environnement (notamment diesel), pas de données en professionnel.	Cohen, 2000 ; Vineis et Husgafvel-Pursiainen, 2005

Tableau 8.IV. Aperçu synthétique et non exhaustif des effets toxicodynamiques des PUF dans l'organisme, au niveau tissulaire.

5.2.2. Effets systémiques

Observations		
	Commentaires	Références (non exhaustif)
(*) Possibilités de localisations cérébrales		
	Liens possibles avec la maladie d'Alzheimer (forte pollution urbaine)	Calderon-Garciduenas et coll., 2004
(*) Perturbations du système cardiovasculaire		
	- troubles de la repolarisation du muscle cardiaque (PUF de C)	Frampton et coll., 2004
	- effets sur la coagulabilité sanguine (PM ₁₀)	Gilmour et coll., 2005 ; Nemmar et coll., 2004
	- effets sur le système sympatho-vagal (CAP, souris)	Chen et Hwang, 2005
(*) Athérosclérose		
	Peut sensibiliser à une rupture d'athérôme et favoriser le décès par crise cardiaque (PM _{2,5} , chez l'homme et chez la souris)	Künzli et coll., 2005 ; Sun et coll., 2005

Tableau 8.V. Aperçu synthétique et non exhaustif des effets systémiques des PUF dans l'organisme.

Bibliographie

- Brown JS, Zeman KL, Bennett WD (2002). Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med* **166**(9) 1240-7.
- Brunekreef B, Forsberg B (2005). Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *Eur Respir J*. **26**(2) 309-318.
- Calcabrini A, Meschini S, Marra M, Falzano L, Colone M, De Berardis B, Paoletti L, Arancia G, Fiorentini C (2004). Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. *Environ Res* **95**(1) 82-91.
- Calderon-Garcidueñas L, Mora-Tiscareno A, Fordham LA, Valencia-Salazar G, Chung CJ, Rodriguez-Alcaraz A, Paredes R, Variakojis D, Villarreal-Calderon A, Flores-Camacho L, Antunez-Solis A, Henriquez-Roldan C, Hazucha MJ (2003). Respiratory damage in children exposed to urban pollution. *Pediatr Pulmonol* **36**(2) 148-161.
- Calderon-Garciduenas L, Reed W, Maronpot RR, Henriquez-Roldan C, Delgado-Chavez R, Calderon-Garciduenas A, Dragustinovis I, Franco-Lira M, Aragon-Flores M, Solt AC, Altenburg M, Torres-Jardon R, Swenberg JA (2004). Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol* **32**(6) 650-658.

- Carter JM, Kennedy JM, Oberdörster G, Clark ED (2004). The use of fluorescently labeled nanoparticles to determine the effect of particle size on translocation from the lung. **The Toxicologist**, summary n° 2133.
- Chalupa DC, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, Frampton MW (2004). Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ Health Perspect* **112(8)** 879-882.
- Chen LC, Hwang JS (2005). IV. Characterization of Acute and Chronic Effects of Ambient Air Fine Particulate Matter Exposures on Heart-Rate Variability. *Inhalat Toxicol* **17(4-5)** 209-216.
- Churg A, Gilks B, Dai J (1999). Induction of fibrogenic mediators by fine and ultrafine titanium dioxide in rat tracheal explants. *Am J Physiol* **277(5 Pt 1)** L975-982.
- Churg A, Stevens B, Wright JL (1998). Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO₂ in a tracheal explant system. *Am J Physiol* **274(1 Pt 1)** L81-86.
- Churg A, Xie C, Wang X, Vincent R, Wang RD (2005). Air pollution particles activate NF-kappaB on contact with airway epithelial cell surfaces. *Toxicol Appl Pharmacol* **208(1)** 37-45.
- Cohen AJ (2000). Outdoor air pollution and lung cancer. *Environ Health Perspect* **108 (Suppl. 4)**, 743-750.
- Cullen RT, Tran CL, Buchanan D, Davis JM, Searl A, Jones AD, Donaldson K (2000). Inhalation of poorly soluble particles. I. Differences in inflammatory response and clearance during exposure. *Inhal Toxicol* **12(12)** 1089-1111
- Dai J, Xie C, Vincent R, Churg A (2003). Air Pollution Particles Produce Airway Wall Remodeling in Rat Tracheal Explants. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29 (3 Pt 1)** 352-358.
- de Jalón EG, Blanco-Príeto MJ, Ygartua P, Santoyo S (2001). PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *Internat J Pharmac* **226(1-2)** 181-184.
- Feikert T, Mercer P, Corson N, Gelein R, Opanashuk L, Elder A, Silva V, Carter J, Maynard A, Finkelstein J, Oberdörster G (2004). Inhaled solid ultrafine particles (UFP) are efficiently translocated via neuronal nasoolfactory pathways. *The Toxicologist* **78(S-1)**, summary n° 2113 (p. 435).
- Ferin J, Oberdörster G, Penney DP (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6(5)** 535-542.
- Fletcher F Hahn, Edward B Barr, Margaret G Ménache, Seagrave JC (2005). Particle Size and Composition Related to Adverse Health Effects in Aged, Sensitive Rats. HEI Research Report 129 (septembre 2005, 84 pages)
- Foster KA, Yazdanian M, Audus KL (2001). Microparticulate uptake mechanisms of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium. *J Pharm Pharmacol*. **53(1)** 57-66.
- Frampton MW, Utell MJ, Zareba W, Oberdörster G, Cox C, Huang LS, Morrow PE, Lee FEH, Chalupa D, Frasier LM, Speers DM, Stewart J (2004). Effects of Exposure to Ultrafine Carbon Particles in Healthy Subjects and Subjects with Asthma. HEI Res Report 126 (Dec 2004)
- Gatti A (2005). Voir CE (2005). Nanopathology. In: Nanotechnology – Proceedings of the Workshop: *Research Needs on Nanoparticles*, held in Brussels, 25-26 January 2005, pages 39-40. Édité par R. Tomellini et C. de Villepin.
- Gatti AM, Montanari S, Monari E, Gambarelli A, Capitani F, Parisini B (2004). Detection of micro- and nano-sized biocompatible particles in the blood. *J Mater Sci Mater Med* **15(4)** 469-472. Voir aussi : <http://www.nanopathology.it/>

- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* **113**(11) 1555-1560.
- Gilmour PS, Morrison ER, Vickers MA, Ford I, Ludlam CA, Greaves M, Donaldson K, MacNee W (2005). The procoagulant potential of environmental particles (PM10). *Occup Environ Med* **62**(3) 164-171.
- Illum L (2004). Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol* **56**(1) 3-17.
- Kato T, Yashiro T, Murata Y, Herbert DC, Oshikawa K, Bando M, Ohno S, Sugiyama Y (2003). Evidence that exogenous substances can be phagocytized by alveolar epithelial cells and transported into blood capillaries. *Cell Tissue Res* **311**(1) 47-51.
- Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A (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) 1513-1530.
- Künzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, Thomas D, Peters J, Hodis HN (2005). Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect* **113**(2) 201-206.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* **111**(4) 455-460.
- Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ (2002). Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc* **61**(1) 123-130.
- Lundborg M, Dahlen SE, Johard U, Gerde P, Jarstrand C, Camner P, Lastbom L (2006). Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. *Environ Res* **100**(2) 197-204.
- Lundborg M, Johard U, Lastbom L, Gerde P, Camner P (2001). Human alveolar macrophage phagocytic function is impaired by aggregates of ultrafine carbon particles. *Environ Res* **86**(3) 244-253.
- Maysinger D, Lovric J, Eisenberg A, Savic R (2006). Fate of micelles and quantum dots in cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006 Sep 1; [Epub ahead of print]
- Miyazaki S, Takahashi A, Kubo W, Bachynsky J, Loebenberg R (2003). Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration. *J Pharm Pharm Sci* **6**(2) 238-245.
- Möller W, Brown DM, Kreyling WG, Stone V (2005). Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium. *Particle Fibre Toxicol* **2**, 7.
- Möller W, Hofer T, Ziesenis A, Karg E, Heyder J (2002). Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* **182**(3) 197-207.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**(4) 411-4. Comment in: *Circulation* 2002 Nov 12; **106**(20) e141-142.
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Nemery B (2004). Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett* **149**(1-3) 243-253.

- Nikula KJ, Vallyathan V, Green FHY et al (2001). Influence of exposure concentration or dose on the distribution of particulate material in rat and human lungs. *Environ Health Perspect* **109**(4) 311-318.
- Nurkiewicz TR, Porter DW, Barger M, Millecchia L, Rao KM, Marvar PJ, Hubbs AF, Castranova V, Boegehold MA (2006). Systemic microvascular dysfunction and inflammation after pulmonary particulate matter exposure. *Environ Health Perspect*. **114**(3) 412-419.
- Oberdörster E (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect* **112**(10) 1058-1062.
- Oberdörster G (2004). Emerging Concepts in Nanoparticle (NP) Toxicology. In: Nanotechnologies: a preliminary risk analysis on the basis of a workshop organized in Brussels on 1-2 March 2004 by the health and consumer protection directorate general of the European Commission, pp. 115-116.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193-199.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **113**(7) 823-839.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004). Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhal Toxicol* **16**(6-7) 437-445.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* **65**(20) 1531-1543.
- Pantarotto D, Briand JP, Prato M, Bianco A (2004). Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)* **1**, 16-17.
- Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* **61**(5) 442-7.
- Renwick LC, Donaldson K, Clouter A (2001). Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **172**(2) 119-127. Comment in: *Toxicol Appl Pharmacol* 2001 Nov 1; **176**(3) 203.
- Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolnikoff M, Saldiva PH (2005). Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of Sao Paulo, Brazil. *Toxicol Sci* **85**(2) 898-905.
- Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G, Kreyling WG (2004). Long-Term Clearance Kinetics of Inhaled Ultrafine Insoluble Iridium Particles from the Rat Lung, Including Transient Translocation into Secondary Organs. *Inhal Toxicol* **16**(6-7) 453-459.
- Sun O, Wang A, Jin X, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD, Aguinaldo JGS, Fayad ZA, Fuster V, Lippmann M, Chen LC, Rajagopalan S (2005). Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *J Am Med Assoc* **294**, 3003-3010.
- Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect* **109** (Suppl. 4), 547-551.

- Tinkle SS (2004). Skin exposure to particles: penetration is dependent on particle size. *The Toxicologist*, summary n° 1852 (p. 381).
- Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Roberts JR, Salmen R, DePree K, Adkins EJ (2003). Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect* **111**(9) 1202-1208.
- Tinkle S, Antonini J, Roberts J et coll. (2002). Cutaneous Application of Beryllium Salts and Oxide Particles Produces Beryllium-Specific Peripheral Sensitization in the C3H/HeOuJ Mice. Beryllium Research Symposium: Basic Mechanisms and Human Health, June 25- 26.
- Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K (2005). Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* **26**(11) 1846-1855.
- Wasdo SC, Roberts SM, Santra S, Munson J, Song Y (2005). Imaging the penetration of RUBPY-doped silica nanoparticles into human and mouse skin with fluorescent microscopy. *Toxicologist*, résumé n° 2186 (page 448).
- Watson AY, Brain JD (1979). Uptake of iron aerosols by mouse airway epithelium. *Lab Invest* **40**(4) 450-459.
- Wetterberg L, Nybom R, Bratlid T, Fladby T, Olsson B, Wigzell H (2002). Micrometer-sized particles in cerebrospinal fluid (CSF) in patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* **379**, 91-95.
- Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A (2004). Quinones and Aromatic Chemical Compounds in Particulate Matter (PM) Induce Mitochondrial Dysfunction: Implications for Ultrafine Particle Toxicity. *Environ Health Perspect* **112**(14) 1347-1358
- Zhang Z, Kleinstreuer C, Donohue JF, Kim CS (2005). Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *J Aerosol Sci* **36**(2) 211-233.

Discussion (3) et conclusions

9

1. Quelle applicabilité de ces connaissances à l'homme ?

S. Binet

1.1. Contexte

Les nano-objets (ou nanoparticules) manufacturés conduisent à la fabrication de nano-matériaux, largement développés pour l'électronique, les domaines biomédical, pharmaceutique, cosmétique, la gestion de l'énergie, la catalyse... Le domaine environnemental, c'est-à-dire les particules ultra-fines (PUF) émises lors des processus de combustion provenant de sources fixes (incinérateurs, chauffage collectifs, soudage...) et mobiles (véhicules), ne sera pas traité dans ce chapitre, de même que les nanoparticules résultant des applications pharmaceutiques des nanotechnologies.

Les propriétés physicochimiques inhabituelles des nanoparticules (NP) proviennent de leur petite taille, de leur composition chimique (pureté, cristallinité, propriétés électroniques...), de leur activité de surface, solubilité, forme et capacité d'agrégation. Leur très faible taille implique des propriétés différentes de celles des particules plus grosses. D'une part, la surface spécifique augmente, avec pour conséquence une plus forte proportion d'atomes en surface des particules et ses corollaires : l'augmentation de la surface réactive et l'augmentation de la fraction de molécules adsorbables. D'autre part, les effets quantiques qui apparaissent à partir d'une taille inférieure à 10-50 nm sont

susceptibles de modifier profondément les propriétés de la particule : apparaissent alors des nouvelles propriétés optiques, magnétiques ou électriques, qui ne peuvent être sans conséquence en termes d'interaction chimique avec les macromolécules organiques (stress oxydant...).

Des études suggèrent que les nanoparticules peuvent affecter les compartiments cellulaires et intracellulaires ainsi que les protéines (Morawska et coll., 2004). De plus, il a été montré que des nanoparticules peuvent traverser les membranes cellulaires et se distribuer dans différents organes à partir de la voie d'entrée pulmonaire. Différentes pathologies ont été évoquées tant chez l'homme pour les PUF de l'environnement que chez l'animal pour les nanoparticules manufacturées. Enfin, l'opinion paraît unanime dans la communauté scientifique que les nanoparticules posent ou poseront des problèmes environnementaux et sont susceptibles de présenter des risques en milieu professionnel.

Des préoccupations sociales se sont cristallisées à partir des résultats sur les effets biologiques résultant de l'exposition de l'homme ou des animaux de laboratoire à ces particules nanométriques. Elles se manifestent en termes d'impact sur la santé humaine et de besoins de prévention tant pour la population générale que pour celle au travail. En conséquence, les scientifiques portent une responsabilité de réponse et les politiques une responsabilité de mise en place de programmes de recherche et de mesures de prévention. La question fondamentale est celle-ci : doit-on attendre de réunir tous les éléments susceptibles de fonder une évaluation rigoureuse des risques au cas par cas, ou doit-on, du fait de l'immensité de la tâche (grand nombre de PUF différentes), proposer des mesures générales de prévention révisables, fondées sur les connaissances actuelles et sur une appréciation raisonnée du principe de précaution ? En d'autres termes, dispose-t-on d'éléments suffisants et applicables permettant de définir aujourd'hui des mesures préliminaires de prévention vis-à-vis de l'exposition aux nanoparticules ?

1.2. Éléments du dossier

Les études disponibles ont démontré plusieurs effets chez l'animal en fonction du type de nanoparticule (composition chimique, taille, forme, conformation cristallographique), mais la plupart des travaux portent sur le petit nombre des NP manufacturées les plus utilisées, dont la silice colloïdale, le dioxyde de titane, le noir de carbone et les oxydes de fer. Ces résultats, montrant des caractéristiques toxicologiques différentes de celles de particules plus grandes, ont cristallisé des incertitudes. Au niveau pulmonaire, certaines NP manufacturées provoquent la formation de granulomes, de fibrose ou de tumeurs. Globalement, les données toxicologiques spécifiques aux nanoparticules demeurent insuffisantes en regard de la diversité des nanomatériaux, et cette situation risque de perdurer étant donné que les scientifiques ne disposent ni de méthodologies

permettant d'évaluer complètement et rapidement la toxicité de ces nouveaux produits, ni des moyens nécessaires.

Globalement, et bien que les traitements de surface doivent être pris en compte, les études montrent que l'activité biologique des NP manufacturées, qu'elle soit néfaste ou bénéfique, tend à s'accroître à mesure que leur taille diminue. L'évolution future des nanotechnologies ne se démarque pas de celles des autres agents chimiques qui l'ont précédée : elle dépendra d'une balance risques/bénéfices favorable et d'une bonne évaluation et gestion du risque.

1.2.1. Caractérisation des expositions aux aérosols de NP manufacturées

L'évaluation de l'exposition aux PUF est un paramètre à envisager prioritairement avant d'évaluer d'éventuels effets sur la santé : l'intérêt des connaissances sur la toxicité des particules inhalées dépendra de la quantité de matériel nanoparticulaire relargué dans l'atmosphère, son évolution, les concentrations inhalées, ainsi que des mesures de protections individuelles et collectives. Les données d'exposition aux PUF sont insuffisantes car récentes, contrairement au très important corpus d'études sur les expositions professionnelles aux agents chimiques et aux poussières.

La voie principale d'exposition est inhalatoire bien que d'autres voies potentielles existent, telles les voies dermiques ou par ingestion (Aitken et coll., 2004). Il est probable, même si peu d'études ont été conduites dans ce domaine, que les concentrations atmosphériques en NP manufacturées unitaires sur les lieux de travail soient peu importantes (Aitken et coll., 2004). À titre d'exemple, la manipulation de nanotubes dans les ateliers de production ne génère que de très faibles concentrations atmosphériques (Maynard et coll., 2004). Dans ce cas, la propriété d'agrégation conduisant à des particules plus grosses, faiblement aérosolisables et faiblement inhalables, est mise en évidence : d'une façon générale, l'individu sera exposé à des aérosols de particules unitaires et agrégées couvrant un spectre dimensionnel de quelques nanomètres à plusieurs micromètres (particules nanostructurées). Il est possible – ceci est en cours de discussion – qu'à diamètre égal un agrégat de nanoparticules ne présente pas les mêmes effets biologiques qu'une particule unitaire de même taille. La mesure de la distribution granulométrique de l'aérosol permettrait d'obtenir des informations précieuses sur les tailles des particules, les surfaces spécifiques, les répartitions en masse par intervalle granulométrique (Kuhlbusch et coll., 2004). Cependant, les procédés de mesure actuels sont peu accessibles et les mesures de distribution en taille dans la gamme submicrométrique complexes à réaliser. La caractérisation des expositions aux aérosols nanostructurés requiert encore des recherches pour le développement d'instruments de mesures portables et abordables

financièrement. Ceci entraîne un déficit de lignes directrices relatives à la protection respiratoire et adaptées au type d'exposition ou à la nature de la NP manufacturée.

1.2.2. Pénétration dermique des nanomatériaux

La peau est exposée aux NP manufacturées lors de l'application de préparations cosmétiques ou pharmaceutiques (TiO_2 , ZnO ; voir chapitre 5, points 1 et 2), soit lors de séjours dans des atmosphères contaminées (fabrication et utilisation de NP manufacturées ou émissions de PUF lors de la combustion de matériaux fossiles). L'analyse des travaux disponibles ne permet pas de conclure d'une façon générale sur la pénétration des NP manufacturées dans la peau. D'autres questions se posent relativement à la cytotoxicité et au devenir des NP manufacturées dans la peau, incluant les aspects de photoactivation et de génération d'espèces activées de l'oxygène (EAO). L'exemple le plus documenté est celui du TiO_2 utilisé dans les crèmes solaires. L'absorption d'un photon ultraviolet par l'anatase, une des formes cristallines du TiO_2 , entraîne la formation d'un électron singulet qui, en réagissant avec l'eau ou l'oxygène, va générer des EAO. Ainsi, le TiO_2 absorbe effectivement les UV mais provoque des effets indésirables en raison de la cytotoxicité des EAO. C'est ainsi que les NP manufacturées de TiO_2 ou ZnO utilisées dans les préparations commerciales sont enrobées avec, par exemple, des oxydes inertes de silice ou d'alumine afin de réduire (mais pas d'empêcher totalement) la production *in situ* d'EAO. Globalement, les données de la littérature montrent pour certaines NP manufacturées qu'elles peuvent pénétrer dans la peau, et que le follicule pileux est un compartiment de la peau dans lequel les NP manufacturées peuvent s'accumuler (pour un examen détaillé, voir chapitre 3, point 3). Des travaux complémentaires sont nécessaires ; ils devront comprendre la recherche des effets toxiques *in situ*.

1.2.3. Dépôt pulmonaire et translocation

La voie la plus commune d'exposition professionnelle est la voie respiratoire. La localisation du dépôt des NP manufacturées, unitaires ou agglomérats, est fonction de leurs diamètres aérodynamiques. Des recherches sont en cours afin de déterminer les facteurs à l'origine de leur agglomération ou désagglomération. Elles permettront notamment de localiser des zones cibles pour les NP manufacturées unitaires résultant de la désagrégation des agrégats. Les nanoparticules ont des dimensions qui provoquent un dépôt pulmonaire par diffusion, et se déposent plus dans les poumons et les voies respiratoires supérieures que les particules de diamètre plus grand (ICRP, 1994 ; Jaques et Kim, 2000). Chez l'homme, les NP manufacturées se déposent dans toutes les régions des voies aériennes et des poumons, mais principalement dans les bronchioles et les alvéoles respiratoires (Kim et Jaques, 2000). Ce dépôt augmente chez l'homme à l'effort (Jaques

et Kim, 2000 ; Daigle et coll., 2003). De plus, leur taille rend probable leur interaction avec des cibles beaucoup plus petites que pour les particules plus grosses, avec pour conséquence d'interférer avec les processus métaboliques cellulaires. La défense de l'organisme semble moins efficace, puisqu'il a été suggéré que leur reconnaissance par les macrophages était diminuée, ce qui induit leur capture par les cellules épithéliales interstitielles et les cellules endothéliales.

Les NP manufacturées peuvent ainsi traverser l'endothélium vasculaire, entrer dans la circulation sanguine et exercer des effets à distance de la voie d'entrée. Des études chez l'animal et chez l'homme ont montré le transfert des PUF vers différents organes (cerveau, foie...) à partir de leur zone de dépôt dans les voies respiratoires (par exemple Oberdörster et coll., 2004 ; Nemmar et coll., 2002) : franchissement de la barrière hémato-encéphalique dans certaines conditions (Kreuter et coll., 2002), pénétration dans le cerveau *via* l'épithélium nasal et le nerf olfactif, passage de la barrière placentaire. Ces données ne doivent pas être considérées comme stabilisées puisque, sur l'exemple d'une publication récente chez l'homme, Wiebert et coll (2006) n'ont pas pu observer une translocation significative de particules de carbone de 35 nm marquées au ^{99}Tc du poumon vers d'autres organes.

1.2.4. Le rôle de la composition chimique

Les travaux portant sur les silices microparticulaires ont montré l'importance de la conformation cristallographique et de la composition chimique de surface dans la compréhension mécanistique des différences d'effets biologiques observés (Fubini et Hubbard, 2003). En ce qui concerne les NP manufacturées, la dimension joue un rôle prépondérant à la fois qualitatif et quantitatif (grande surface spécifique) dans les phénomènes de toxicité induite par les activités de surface (exemple formation d'espèces actives de l'oxygène, EAO ; Dick et coll., 2003).

L'importance de la composition chimique des NP manufacturées a été démontrée par les travaux de physico-chimistes (revue de Jefferson, 2000). En effet, l'étude des microstructures des NP manufacturées d'oxydes métalliques a permis de décrire des configurations de surface différentes de celles du matériau non nanométrique : déficits anioniques à la surface des NP manufacturées d'oxyde de cérium et déficits cationiques pour les NP d'oxyde ferrique (Fe_3O_4). Jefferson cite aussi la possibilité de formation de nouvelles formes cristallographiques n'existant pas dans l'équivalent non nanométrique, tel le trioxyde de tungstène (m-WO_3). Il conclut de ce qui a été démontré dans la littérature « qu'il est imprudent de supposer que les structures des NP sont identiques à celle des matériaux d'origine, bien qu'elles puissent être basées sur une configuration atomique connue. Il s'ensuit donc que leurs propriétés physicochimiques sont peu vraisemblablement celles du matériau d'origine et peuvent, comme leur structure elle-même, dépendre fortement de leur dimension particulière. »

Des effets biologiques différenciés en fonction de la composition chimique ont été décrits dans la littérature. Ainsi, certaines particules de faible toxicité intrinsèque tel le dioxyde de titane micrométrique sont à l'origine d'effets tels que l'inflammation pulmonaire, l'altération tissulaire et la fibrose dès lors qu'ils sont administrés à masse comparable sous la forme de NP (Oberdörster et coll., 1992, 1996 ; Tran et coll., 2000). Chez l'homme, des études d'exposition contrôlée ont confirmé l'importance de la composition chimique dans les effets observés à l'exemple des différences d'inflammation pulmonaire entre l'oxyde de magnésium et l'oxyde de zinc (Kuschner et coll., 1997). *In vitro*, des différences d'effets ont été observées entre Ag, Al₂O₃, MoO₃, Fe₃O₄, TiO₂ (Braydich-Stolle et coll., 2005 ; Hussain et coll., 2005).

Les nanoparticules présentent aussi un type de risque potentiel lié à leur composition chimique : si des agents chimiques considérés comme toxiques entrent dans leur composition, les nanopoudres peuvent exercer des effets néfastes liés à la quantité de ces agents relarguée dans les milieux biologiques par dissolution. Enfin, les NP manufacturées peuvent être traitées en surface avec des substances minérales (silice) ou organiques pour limiter leur agrégation (TiO₂ ; Borm, 2005). Or, il a été démontré que ces traitements de surface modifient les potentialités toxicologiques des particules (exemple nanotubes de carbone : Sayes et coll., 2006). Il sera donc nécessaire d'en tenir compte dans les futures évaluations de risque.

1.2.5. Toxicité pulmonaire

L'amorce d'un profil toxicologique propre aux NP manufacturées est apparu dans les années 1990. Une des premières études a démontré que le TiO₂ de 20 nm provoquait, à masse égale, plus d'inflammation dans les poumons de rats que des particules de TiO₂ de 250 nm (Ferin et coll., 1992). Avant cette étude, le TiO₂ micrométrique était considéré comme une poudre inerte, utilisée comme contrôle négatif pour nombre d'études sur la toxicité des particules. La même année, Oberdörster et coll. (1992) estimaient que l'augmentation de la toxicité pulmonaire des PUF, reliée en partie à leur plus grande surface spécifique, nécessitait la fixation de valeurs limites atmosphériques différentes de celles des mêmes particules de granulométrie plus grande. Ultérieurement, d'autres études ont confirmé que l'inflammation pulmonaire (revue : Oberdörster, 2001), habituellement mesurée par la numération des granulocytes neutrophiles dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, était reliée à la surface des particules administrées par inhalation ou instillation ainsi qu'à la nature chimique de la particule. Donaldson et coll. listaient dès 1998 différents mécanismes à l'origine de la toxicité des PUF, en particulier : i) l'augmentation de la surface spécifique est susceptible d'entraîner, en fonction des caractéristiques chimiques, des effets sur la génération de radicaux libres ; ii) un grand nombre de particules peut excéder la capacité de phagocytose des macrophages et, par voie de conséquence, laisser de nombreuses particules libres en contact avec les cellules

épithéliales ; iii) les PUF, de par leur faible taille et leur chimie de surface, peuvent être internalisées par les cellules épithéliales. Il semble que les nanomatériaux aient en général une faible solubilité, en faveur d'une biopersistance importante, tant au niveau de la porte d'entrée (tissu pulmonaire) que d'organes atteints à distance après translocation vers le sang par exemple (Oberdörster, 2005). Des NP manufacturées peu solubles et historiquement considérées comme « non toxiques » telles que le TiO_2 ou le noir de carbone provoquent de la fibrose et des tumeurs pulmonaires chez le rat (Heinrich et coll., 1995 ; Oberdörster, 2001) pour des quantités massiques administrées inférieures à celles des particules micrométriques. Le mécanisme dit de surcharge pulmonaire a été évoqué pour expliquer ces effets : présence persistante de particules, diminution de la clairance macrophagique, réponse inflammatoire chronique, fibrose et cancérogenèse (ILSI, 2000). En fait, la tendance à estimer que toutes les NP manufacturées sont plus toxiques et inflammatoires que les particules fines de même composition chimique est basée essentiellement sur un petit nombre de publications portant sur le TiO_2 et le noir de carbone.

Des travaux ont montré que relier ces effets avec la surface des particules était une hypothèse simplificatrice qui ne rendait pas compte de différentes observations : il existe des différences d'activité inflammatoire pour une même surface (lien avec la composition chimique) ; les nanoparticules peuvent être internalisées dans les cellules, les mitochondries et le noyau dans lequel elles sont susceptibles d'exercer des effets directs sur l'ADN ; d'autres caractéristiques physiques devraient être directement prises en compte, car elles sont susceptibles de moduler la toxicité d'une NP manufacturée de composition chimique donnée : le traitement de surface, la cinétique d'agrégation/désagrégation, la méthode de synthèse en phase gazeuse ou liquide, la forme, la densité de charges de surface (Tsuji et coll., 2006).

Les nanoparticules existent depuis fort longtemps et certaines n'ont pas manifesté d'effets toxiques majeurs chez l'homme. Un des exemples dont la documentation devient conséquente est celui du TiO_2 pour lequel les études épidémiologiques n'ont pas apporté la preuve d'une augmentation nette de la mortalité par cancer pulmonaire, mais elles n'ont pas été conçues pour étudier strictement la relation entre la taille des particules et l'effet cancérogène. Le TiO_2 , pour ses formes micro- et nanométriques, est actuellement l'objet d'une évaluation du risque cancérogène par le NIOSH (US National Institute for Occupational Safety and Health, 2005). Il est conclu dans ce projet de document que les effets tumorigènes chez le rat ne sont pas liés aux propriétés chimiques du TiO_2 mais à la taille et à la surface des particules agissant selon un mécanisme génotoxique secondaire associé à une inflammation permanente. Il est aussi conclu, d'après les données disponibles, que les expositions professionnelles à de faibles concentrations de TiO_2 n'induiront qu'un risque négligeable de cancer pulmonaire chez les ouvriers. En revanche, le NIOSH se déclare préoccupé du potentiel cancérogène du TiO_2 ultrafin si des travailleurs sont exposés à la valeur limite actuelle (VME). Les expositions par inhalation qui ont été réalisées chez le rat, avec des concentrations entraînant des

tumeurs pulmonaires liées à une surcharge pulmonaire, ne seraient pas transposables à l'homme pour toutes les expositions mais seulement pour les plus élevées (NIOSH, 2005). Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC, 2006) a classé le dioxyde de titane et le noir de carbone en catégorie 2B, c'est-à-dire « peut-être cancérigène pour l'homme » avec les mentions suivantes : indications de cancérogénicité insuffisantes chez l'homme et suffisantes chez l'animal de laboratoire. Les monographies ne sont pas encore parues, mais il est vraisemblable que les études portant sur les NP de ces composés aient été prises en compte et aient influé sur le classement (Baan et coll., 2006).

En conclusion, les résultats des études toxicologiques et épidémiologiques conduisent à deux constatations principales sur les effets potentiels des NP manufacturées :

- les résultats actuels montrent globalement que les PUF environnementales sont plus dangereuses en termes de pathologies pulmonaires que les particules plus grosses de même composition chimique. Bien que les caractéristiques des PUF environnementales et des NP manufacturées diffèrent, les éléments dosimétriques et toxicologiques dérivés de ces études environnementales pourraient s'appliquer aux nanoparticules en milieu de travail. Par ailleurs, les mécanismes biologiques des maladies reliées à une exposition aux particules (stress oxydatif, inflammation, production de chimiokines et/ou de facteurs de croissance cellulaire ; Mossman et Churg, 1998 ; Castranova, 2001) paraissent aussi être reliés à la réponse pulmonaire aux PUF ou aux nanoparticules (Donaldson et coll., 1998 ; Dick et coll., 2003 ; Oberdörster et coll., 2005). Les études toxicologiques ont montré que les propriétés physicochimiques, qui participent à la toxicité des PUF de l'environnement, pourraient aussi être des paramètres importants pour les nanoparticules manufacturées (Oberdörster et coll., 2005) ;
- le paramètre masse doit s'effacer au profit de la surface spécifique et de l'activité de surface en tant que prédicteurs de la dangerosité des nanoparticules et des PUF (Oberdörster et coll., 1992, 1996 ; Peters et coll., 1997 ; Moshhammer et Neuberger, 2003). Cette hypothèse est fondée sur les effets observés chez les rongeurs exposés à différents types de PUF (dioxyde de titane, noir de carbone, particules diesel...) ainsi que chez l'homme (fumées diesel ou de soudage). Ces études indiquent que, pour une même masse de particules, les nanoparticules sont plus toxiques que les particules plus grosses de même composition chimique et propriétés de surface. Enfin, la nature chimique ainsi que d'autres paramètres physiques évoqués plus haut sont aussi des paramètres incontournables (Borm et coll., 2006).

1.3. Applicabilité et prévention

Les nanomatériaux constituent une famille d'agents chimiques qui présentent de multiples différences en termes de composition et de caractéristiques dimensionnelles. Les

premiers travaux sur les nanomatériaux ainsi que les enseignements de la toxicologie montrent que l'évaluation du danger d'une nanopoudre donnée devra être conduite pour toutes ses caractéristiques physiques : diamètre, rapport diamètre/longueur, porosité, surface spécifique, nombre de particules par unité de masse, solubilité, cristallographie, capacité d'agrégation et stabilité des agrégats dans les milieux organiques... Il est probable qu'il faille attendre de nombreuses années avant de connaître précisément les types de nanoparticules et les doses associées présentant un réel danger pour l'homme et son environnement. En effet, l'évaluation des effets potentiels sur la santé après exposition à un agent chimique prend en compte la magnitude et la durée de l'exposition, la biopersistence, la toxicité intrinsèque en fonction de la (ou des) cible(s), ainsi que de paramètres liés aux variabilités interindividuelles. Les connaissances sur les particules micrométriques peuvent servir de support et d'orientation pour une première estimation des effets des NP de même nature. Néanmoins, l'actuel corpus de connaissances sur les NP manufacturées montre qu'il existe de nombreuses incertitudes sur leurs effets potentiels sur la santé par rapport aux particules micrométriques. Ce déficit porte en particulier sur la méconnaissance des voies d'exposition, des modes de transfert vers d'autres organes à partir de la voie d'exposition, des modes de pénétration et cibles intracellulaires, des interactions physicochimiques spécifiques, des cinétiques d'agrégation/désagrégation dans les milieux biologiques, de la spéciation.

La notion d'applicabilité est indissociable, historiquement du moins, de la notion d'évaluation du risque car elle recouvre la notion d'être en capacité de transposer des connaissances à l'homme et, par conséquent, de disposer de toutes les informations nécessaires. Cette démarche de prévention des risques résultant d'une exposition à un agent chimique implique avant tout une évaluation scientifique des effets potentiels en fonction de l'intensité de l'exposition. En s'appuyant sur les résultats de l'évaluation des risques, il est possible de proposer une gestion du risque visant à éliminer ou, en cas d'impossibilité, à réduire au minimum, le (ou les) risque(s) imputable(s) à la (ou aux) substance(s) chimique(s) en cause. Ceci nous amène à poser la question suivante, objet de ce chapitre : les connaissances accumulées sur les PUF tant chez l'homme que chez l'animal sont-elles déjà applicables à la population générale ou à celle du monde professionnel ?

Pour mémoire, l'évaluation du risque distingue quatre phases distinctes et ordonnées d'examen des données permettant d'apprécier les conséquences sanitaires ou écologiques de l'exposition à telle ou telle substance : la reconnaissance du danger, l'évaluation de la relation dose-réponse, l'évaluation de l'exposition et la caractérisation du risque (NAS, 1983). Selon le document fondateur du NAS (1983), l'évaluation du risque est « l'utilisation d'une base factuelle permettant de définir les effets sur la santé résultant de l'exposition d'individus ou de populations à des agents et des situations dangereux ». L'objectif est de déterminer un niveau d'exposition sans danger pour la santé humaine. Les points faibles qui ont été évoqués dans cette démarche sont de deux types :

l'exagération dans l'estimation des risques conduit à des dépenses inutiles, tandis que leur sous-estimation conduit à négliger des impacts significatifs. Il est fondé de réaliser une évaluation des risques pour un agent chimique particulier, et il est généralement accepté de considérer une évaluation séparée pour chaque forme physicochimique d'un agent donné. Ainsi, il sera nécessaire de mener une évaluation de risque pour chaque PUF, même si l'élément constitutif a déjà été l'objet d'une telle évaluation. En effet, les propriétés connues de la substance d'origine sont partiellement ou totalement inapplicables à la prédiction des risques potentiels des NP manufacturées. Lors d'un groupe de travail organisé par la Commission européenne, une des recommandations des experts a été d'attribuer un numéro CAS spécifique dès la création d'une NP manufacturée, car la fabriquer revient à créer un nouvel agent chimique. Cette attribution permettrait d'envisager des évaluations de risque spécifique (Commission européenne, 2004b). Cette proposition paraît d'autant plus importante que des évaluations de risque vont être conduites selon le nouveau cadre réglementaire des produits chimiques dans l'UE (système REACH d'enregistrement, d'évaluation et d'autorisation des produits chimiques) et qu'il existe deux dispositions qui laissent craindre que les NP ne seront pas évaluées : 1) seule la composition chimique de la substance pure est envisagée et non pas l'aspect dimensionnel de sa forme particulière, lequel comporte des incidences toxicologiques ; 2) ces évaluations ne seront exigées que pour les substances produites ou importées à plus de 100 t/an, et celles produites ou importées à moins d'une tonne/an ne seront même pas enregistrées ; or la plupart des NP ne seront produites ou importées qu'à faible volume (Aitken et coll., 2004).

Pour la Commission des communautés européennes (2004a) « Les nanotechnologies doivent être développées de manière sûre et responsable. Les principes éthiques applicables doivent être observés et les risques potentiels pour la santé, la sécurité ou l'environnement doivent être étudiés scientifiquement dans la perspective d'une éventuelle réglementation. Les incidences sur la société doivent être analysées et prises en compte... Plus généralement, la protection de la santé publique, de l'environnement et des consommateurs implique que les intervenants dans le développement des nanotechnologies – notamment les chercheurs, les concepteurs, les producteurs et les distributeurs – abordent tout risque potentiel de manière franche, aussi précocement que possible, en s'appuyant sur des données et des analyses scientifiques fiables et en utilisant les méthodes appropriées. Il s'agit d'un véritable défi dans la mesure où il est difficile de prévoir quelles seront les propriétés des produits issus des nanotechnologies, puisqu'il faut pour cela prendre en compte non seulement les phénomènes de la physique classique, mais aussi les effets de la mécanique quantique. À maints égards, le façonnage d'une substance par le recours aux nanotechnologies peut être comparé à la création d'un produit chimique nouveau. Par conséquent, le traitement des risques potentiels que présentent les nanotechnologies pour la santé publique, l'environnement et les consommateurs passe par l'évaluation des possibilités de recyclage des données

existantes et la production de données toxicologiques et écotoxicologiques nouvelles propres aux nanotechnologies (y compris des données concernant la relation dose-effet et l'exposition). Il requiert également l'examen et, si nécessaire, l'adaptation des méthodes d'évaluation des risques. Concrètement, le traitement des risques potentiels associés aux nanotechnologies implique une intégration de l'évaluation des risques dans toutes les étapes du cycle de vie des produits issus des nanotechnologies. »

Réfléchir sur l'applicabilité de résultats scientifiques suppose soit un corpus de résultats suffisant pour réaliser une évaluation de risque, soit envisager l'application de mesures préventives en cas de résultats inquiétants mais insuffisants en termes de certitude. Le principe de précaution, inscrit dans certains textes de loi (exemple loi Barnier de 1995 en France) impose la prise de mesures immédiates et proportionnées dans l'attente d'une confirmation des risques potentiels à éviter (revue de Guillemy et Rouyère, 2006). Philippe Kourilsky (2000) précisait ainsi : « La notion de principe de précaution est apparue au cours des années 1980, à l'occasion de débats relatifs aux problèmes internationaux d'environnement, avant de recevoir une consécration publique en 1992, à l'occasion de la Conférence de Rio. La France est le premier pays à l'avoir inscrit dans son droit interne. La loi du 2 février 1995, dite loi Barnier, en fournit une définition, insérée à l'article L.200-1 du Code rural qui dispose que « l'absence de certitudes, compte tenu des connaissances scientifiques et techniques du moment, ne doit pas retarder l'adoption de mesures effectives et proportionnées visant à prévenir un risque de dommages graves et irréversibles à l'environnement à un coût économiquement acceptable. ». Mégie (1997) écrivait sur la relation entre scientifiques et politiques : « ... Les politiques exigent une réduction des marges d'incertitude. Ils s'efforcent de faire préciser les conséquences potentielles en termes directement applicables à la prise de décision. Si une telle démarche est parfaitement légitime, il importe cependant qu'elle prenne en compte la nécessité de gérer une incertitude. En effet, les prévisions fondées sur les modèles scientifiques ne doivent constituer qu'une donnée d'entrée dans la prise de décision. » Des agences ont ainsi décidé qu'il était nécessaire de procéder à une évaluation des risques « générique » ou préliminaire pour l'ensemble des PUF (Commission européenne, 2004b ; EPA, 2005 ; NIOSH draft, 2005). D'autres institutions souhaitent dégager des voies de recherches prioritaires (The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004 ; Commission des communautés européennes, 2004a ; Thomas, 2006 ; Programme Santé-Environnement – Santé-Travail, 2005). En effet, l'évaluation des risques exige l'utilisation de données scientifiques et de jugements, mais aussi de différentes hypothèses prises par défaut lorsque les données brutes n'existent pas (Graham, 1995). Pour d'autres, les données brutes ont été considérées comme suffisantes et ont permis de mener à terme des évaluations spécifiques pour un agent chimique donné. À notre connaissance et à ce jour, seuls sont concernés le noir de carbone et le dioxyde de titane (NIOSH, 2005 ; CIRC, 2006). La prise de décision est d'ores et déjà présente dans le débat sur les NP, à l'exemple de l'institut québécois de recherche Robert-Sauvé

en santé et en sécurité du travail (IRSST) qui écrivait, dans un rapport sur les effets à la santé reliés aux nanoparticules (Ostiguy, 2006) : « Compte tenu des nombreuses inconnues reliées aux nanoparticules, à leurs effets potentiels sur la santé et aux risques documentés de toxicité des particules ultra-fines chez l'homme, l'instauration de procédures strictes de prévention demeure la seule façon de prévenir tout risque de développement de maladies professionnelles. Ainsi, les populations potentiellement exposées aux nanoparticules doivent être prudentes et appliquer des mesures sécuritaires d'élimination à la source, de contrôle de l'exposition et de protection individuelle, aussi bien au niveau de la production que de la mise en œuvre et de l'utilisation de ces produits. ». Autre exemple, le Commissariat à l'énergie atomique français (CEA) qui, dans l'attente des conclusions des travaux de la recherche sur la toxicologie des nanoparticules, applique le principe de précaution en mettant en œuvre des techniques de confinement utilisées dans le nucléaire pour la protection de l'environnement et de son personnel travaillant dans le domaine des nanoparticules (Rouillon et Tardif, 2005).

La protection de la santé de l'homme au travail est basée sur la connaissance des risques associés à la composition chimique d'un agent donné. Les nano-objets présentent des risques originaux liés non seulement à leur taille mais aussi à leurs structure et composition chimique. À l'heure actuelle, l'incertitude persiste sur leur contribution aux risques professionnel et environnemental. Cependant, les travaux réalisés tant chez l'homme que chez l'animal, incluant aussi les particules atmosphériques, montrent des effets liés à leurs caractéristiques citées plus haut. Ces informations peuvent être considérées comme insuffisantes dans le contexte d'une évaluation du risque mais, en attendant, elles sont suffisantes pour introduire des recherches en vue d'une production la moins polluante possible, ainsi que prescrire des mesures de protection individuelles et collectives en ambiance de travail.

Conclusion

Les acquis sur la compréhension de la toxicité des nanoparticules sont très limités et ne permettent pas une évaluation quantitative du risque ou une extrapolation à l'homme, exception faite du TiO_2 et du noir de carbone. De plus, des informations sont disponibles pour une partie des NP manufacturées appartenant à une classe de produit de même composition chimique mais de structure cristallographique différente, à l'exemple des fullerènes, qui peuvent contenir de 28 à plus de 100 atomes de carbone. En dépit de ces limitations, les effets biologiques observés ainsi que les signes d'appel reliés aux caractéristiques physicochimiques des nanoparticules justifient de prendre dès à présent des mesures de limitation de l'exposition des personnes potentiellement exposées. L'application de mesures de prévention, notamment de réduction de l'exposition, est le seul moyen de limiter ou d'enrayer le risque de développement de maladies professionnelles dans les secteurs concernés.

Ainsi, pour la multitude de produits nanostructurés existant ou à venir, l'attitude à tenir devrait reposer essentiellement sur une application pondérée et actualisée du principe de précaution en fonction des avancées de la recherche sur les effets adverses biologiques. Concrètement, il s'agira de définir des pratiques sécurisées de travail au fur et à mesure de la publication d'informations stabilisées sur les effets biologiques des NP manufacturées. Plus généralement, car les contextes professionnels sont diversifiés, les mesures de prévention devront être décidées au sein de groupes multidisciplinaires et, pour certaines situations, au cas par cas. Ces dispositions sont en accord avec l'option 5 issue de l'analyse préliminaire des risques réalisée par le groupe de travail réuni par la Commission européenne (2004b), lequel indique qu'il serait nécessaire :

« – d'éviter les dangers et risques relatifs aux nanotechnologies, en prenant des mesures pratiques lorsque les connaissances scientifiques sont incomplètes ou en cours de constitution ;

– d'établir un cadre dans lequel (a) les scientifiques, les industriels, et les citoyens peuvent influencer sur les nanotechnologies et (b) les nanotechnologies peuvent se développer sans risque ;

– de surveiller le développement des nanotechnologies en acquérant et en produisant des données appropriées, en maintenant ouverte la possibilité d'une réglementation future et en s'assurant qu'une telle réglementation serait fondée sur des données plus complètes et une compréhension scientifique plus profonde. »

Bibliographie

- Aitken RJ, Creely KS, Tran CL (2004). Nanoparticles: an occupational hygiene review. Institute of Occupational Medicine, Health and Safety Executive, HSE Research report 274, 113 pp.
- Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group (2006). Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol.* **7** 295-296. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2006 May; **7** 365.
- Borm PJA (2005). Hazards and risks of nanomaterials: a look forward. First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials, 12-14/10/2004, Buxton, Grande-Bretagne. Rapport édité par le Health and Safety Executive Grande-Bretagne et le National Institute for Occupational Safety and Health, États-Unis, juillet 2005, p 65-71.
- Borm P, Klaessig FC, Landry TD, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K, Trottier R, Wood S (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part V: Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicol Sci* **90**, 23-32.
- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager J, Hofmann MC (2005). *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germ-line stem cells. *Toxicol Sci* **88**, 412-419.
- Castranova V, Ma JY, Yang HM, Antonini JM, Butterworth L, Barger MW, Roberts J, Ma JK (2001). Effect of exposure to diesel exhaust particles on the susceptibility of the lung to infection. *Environ Health Perspect* **109**, 609-612.

- CIRC (2006). Noir de carbone, dioxyde de titane et talc non asbestiforme. Summary of data reported and Evaluations, Centre international de recherche sur le cancer, Vol. 93.
- Commission des communautés européennes (2004a). Vers une stratégie européenne en faveur des nanotechnologies. Communication de la Commission, COM(2004) 338 final, Bruxelles le 12.5.2004, 30 pages.
- Commission européenne (2004b). Nanotechnologies: a preliminary risk analysis. Workshop organized in Brussels on 1–2 March 2004 by the Health and Consumer Protection Directorate General of the European Commission, 143 pages.
- Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, Frampton MW (2003). Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhalation Toxicol* **15**, 539–552.
- Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* **15**, 39–52.
- Donaldson K, Li XY, MacNee W (1998). Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci* **29**, 553–560.
- EPA (2005). U.S. Environmental Protection Agency - Nanotechnology White Paper. Nanotechnology Workgroup, External Review Draft December 2, 2005, 134 p.
- Ferin J, Oberdörster G, Penney DP (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**, 535–542.
- Fubini B, Hubbard A (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med* **34**, 1507–1516.
- Graham JD (1995). Historical perspective on risk assessment in the federal government. *Toxicology* **102**, 29–52.
- Guillemy N, Rouyère A (2006). Évolution du contexte réglementaire et de la jurisprudence. In : *La question de la précaution en milieu professionnel*. Ouvrage réalisé sous la direction d'Olivier Godard, EDP Sciences, Les Ulis, France ; 65–80.
- Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K (1995). Chronic inhalation exposure of Wistar rats and 2 different strains of mice to diesel-engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol* **7**, 533–556.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ (2005). *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* **19**, 975–983.
- ICRP (1994). Human respiratory tract model for radiological protection. Oxford, England: Pergamon, Elsevier Science Ltd., International Commission on Radiological Protection Publication n° 66.
- ILSI (2000 ; aucun nom d'auteur n'est cité). The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhal Toxicol* **12**, 1–17.
- Jaques PA, Kim CS (2000). Measurement of total lung deposition of inhaled ultrafine particles in healthy men and women. *Inhal Toxicol* **12**, 715–731.
- Jefferson DA (2000). The surface activity of ultrafine particles. *Philos T Roy Soc A* **358**, 2683–2692.
- Kim CS, Jaques PA (2000). Respiratory dose of inhaled ultrafine particles in healthy adults. *Philosophical Transactions: Math Phys Engin Sci* **358**, 2693–2705.
- Kourilsky P, Viney G (2000). *Le principe de précaution*. Rapport au premier ministre, Éditions Odile Jacob, la documentation française (<http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/BRP/004000402/0000.pdf>)

- Kreuter, J., D. Shamenkov, V. Petrov, P. Ramge, K. Cychutek, C. Koch-Brandt, and R. Alyautdin (2002). Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J. Drug Targeting* **10**, 317–325.
- Kuhlbusch TA, Neumann S, Fissan H (2004). Number size distribution, mass concentration, and particle composition of PM₁, PM_{2.5}, and PM₁₀ in bag filling areas of carbon black production. *J Occup Environ Hyg* **1**, 660–671.
- Kuschner WG, Wong H, D'Alessandro A, Quinlan P, Blanc PD (1997). Human pulmonary responses to experimental inhalation of high concentration fine and ultrafine magnesium oxide particles. *Environ Health Perspect* **105**, 1234–1237.
- Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V (2004). Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health A*. **67**, 87–107.
- Mégie G (1997). Incertitude scientifique et décision politique : le cas « historique » de l'ozone atmosphérique. In : *Le principe de précaution*. Ouvrage réalisé sous la direction d'Olivier Godard, Éditions de la Maison des sciences de l'homme, INRA, Paris, pp. 215–243.
- Morawska L, Moore MR, Ristovski ZD (2004). Health impacts of ultrafine particles: desktop literature review and analysis. Australian Government, Department of the Environment and Heritage, Commonwealth of Australia, 311 pages.
- Moshhammer H, Neuberger M (2003). The active surface of suspended particles as a predictor of lung function and pulmonary symptoms in Austrian school children. *Atmos Environ* **37**, 1737–1744.
- Mossman B, Churg A (1998). Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 1666–1680.
- NAS (US National Academy of Sciences) (1983). Risk assessment in the Federal Government: Managing the process. National Academy Press, Washington, DC.
- Nemmar A, Hoet PHM, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**, 411–414.
- NIOSH draft (2005). Evaluation of health hazard and recommendations for occupational exposure to titanium dioxide. Current intelligence bulletin, draft, November 22, 2005, 158 pages.
- Oberdörster G (1996). Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhal Toxicol*, **8**, 73–89.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193–199.
- Oberdörster G (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* **74**, 1–8.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* **16**, 437–445.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **113**, 823–839.
- Ostiguy C, Lapointe G, Trottier M, Ménard L, Cloutier Y, Boutin M, Antoun M, Normand C (2006). Les effets à la santé reliés aux nanoparticules. IRSST, Montréal, Canada, Rapport R-451, 55 p.
- Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 1376–1383.

- Programme Santé-Environnement – Santé travail (2005). Nanoparticules : les axes prioritaires. 1^{er} appel à projets de recherche. Annexe 1, pp 40-41.
- Rouillon F, Tardif F (2005). La prise en compte des risques liés aux nanoparticules. *Clefs CEA* n°52, 6 pp.
- Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, Beach JM, Moore VC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausman KD, Colvin VL (2006). Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*. *Toxicol Lett* **161**, 135-142.
- The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. 24 July 2004 (<http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>), 127 pages.
- Thomas K, Aguar P, Kawasaki H, Morris J, Nakanishi J, Savage N (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part VIII: International efforts to develop risk-based safety evaluations for nanomaterials. *Toxicol Sci* **92**, 23-32.
- Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD, Donaldson K (2000). Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhalation Toxicology* **12**, 1113-1126.
- Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, Santamaria AB (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part IV: Risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci* **89**, 42-50.
- Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Falk R, Philipson K, Lundin A, Larsson S, Moller W, Kreyling WG, Svartengren M (2006). No significant translocation of inhaled 35-nm carbon particles to the circulation in humans. *Inhal Toxicol* **18**, 741-747.

2. Quelles mesures de prévention définir ou envisager ?

Introduction : mesures générales de prévention

(VDI, 2004)

B. Hervé-Bazin

En raison de l'insuffisance des connaissances relatives aux dangers pour la santé humaine attachés à la fabrication de PUF et à l'utilisation de produits en contenant, il n'existe pas de réglementation particulière dans ce domaine. Cependant, les nanomatériaux présentent des propriétés physiques, chimiques et biologiques extrêmement variables, et les procédés mis en œuvre pour la recherche et le développement, la production, ou l'utilisation sont également susceptibles d'une grande diversité. C'est pourquoi des mesures de précaution doivent être définies et mises en œuvre jusqu'à ce que soient mieux connus l'importance des expositions aux PUF et les risques correspondants (NIOSH, 2005).

Une première précaution consiste à appliquer les exigences et recommandations générales applicables aux substances chimiques, notamment la directive 98/24 du 7 avril 1998 relative à la santé et la sécurité des travailleurs exposés aux agents chimiques. Celle-ci demande, entre autres choses, la fixation de valeurs limites mais, à part quelques cas particuliers (comme pour les noirs de carbone ou les particules diesels, ou encore certaines silices amorphes), les connaissances toxicologiques sont insuffisantes pour établir des valeurs solidement fondées ; font également obstacle des difficultés techniques – notamment en métrologie – dont se préoccupent activement différents centres de recherche en hygiène et sécurité du travail tels que le BIA, le HSE, l'INRS, ou encore le NIOSH. Il est également nécessaire de s'attaquer au problème de la normalisation des méthodes, nationalement et internationalement, pour éviter que les données obtenues dans une région ou un pays soient inutilisables ailleurs, ainsi que pour favoriser une cohérence minimale entre décisions prises à partir de ces données.

Il faut clairement affirmer qu'il n'existe pas de PUF « générique », c'est-à-dire qui présenterait les dangers des PUF en général. Certaines propriétés toxicologiques, en particulier liées à l'inflammation pulmonaire, dépendent globalement plutôt du nombre ou de la surface des particules, ce qui permet une approche de prévention ou de précaution, mais celle-ci devra être, dès que possible, complétée ou remplacée par une approche au cas par cas, en fonction de la nature de la substance et de ses propriétés spécifiques.

Dans tous les cas où des données sont disponibles pour des tailles « classiques » (micrométriques ou plus grosses) de particules de même nature chimique, l'hypothèse minimale pour élaborer une prévention est que les PUF correspondantes présentent au moins la même toxicité et sont probablement plus dangereuses (HSE, 2004).

Le schéma général de la démarche de prévention est le suivant (Mark, 2004) :

- identification des dangers présentés par l'agent chimique ;
- évaluation des risques pour la santé au travail en fonction des procédés appliqués et des modes de travail ;
- mesures à prendre pour prévenir ou limiter le risque ;
- vérification de l'efficacité des mesures prises.

Les principales options de prévention sont les suivantes :

- modification du procédé ou de l'activité de façon à ne plus produire ou utiliser la substance dangereuse ;
- remplacement de la substance par une autre, moins dangereuse ;
- utilisation de la substance sous une forme plus sûre (par exemple à l'état aggloméré ou en pastilles, ou en milieu liquide, plutôt qu'en poudre) ;
- optimisation du procédé pour limiter l'exposition, ou mise en vase clos ;

- contrôle de l'exposition à la source d'émission (aspiration locale) ;
- recours à un équipement de protection individuelle, en principe en dernier recours uniquement.

Sur les lieux de travail, il est toujours possible d'évaluer divers facteurs qui peuvent contribuer aux risques :

- quantités produites ;
- exposition potentielle et voies d'exposition des travailleurs (par inhalation, par voie cutanée, voire par voie orale), notamment à la production, à la manipulation, à l'utilisation ;
- propriétés chimiques (composition, réactivité, solubilité...) et facteurs physiques (facteur de forme, caractéristiques des particules isolées et agglomérées, surface spécifique...) ;
- données toxicologiques (y compris recherche de coexpositions susceptibles d'aggraver le risque) ;
- données d'exposition ;
- performances réelles des dispositifs de prévention (aspiration, filtres, gants...) pour les produits manipulés ;
- le risque d'explosion augmentant lorsque la taille des particules décroît, il peut être nécessaire de le quantifier (voir 2.2, ci-après).

Dans le cas des PUF, il est bon de savoir que l'efficacité de filtration d'un filtre en profondeur passe par un minimum vers 200 nm (profondeur maximale de pénétration ; voir chapitre 1, point 3). La plupart des essais d'efficacité des filtres sont réalisés avec des particules de cette taille. Ne pas oublier toutefois que les PUF passeront par la moindre fuite (défaut du filtre, mauvais ajustement...). L'hypothèse a été émise que l'efficacité de filtration chuterait à nouveau pour des PUF de taille inférieure à 2 nm, mais elle reste à vérifier.

2.1. Mesures générales de prévention sur les lieux de travail

La production de PUF requiert normalement l'isolement complet du procédé (vase clos). L'exposition peut toutefois se produire lors de la manipulation des produits formés, autant que lors du nettoyage ou de la maintenance des installations.

L'évaluation de la pollution de l'air ambiant et l'importance potentielle de l'exposition par voie pulmonaire et/ou par voie cutanée est au centre du système.

- a) *Modification du procédé de fabrication.* Dans la mesure du possible, la fabrication doit être réalisée en phase liquide plutôt qu'en phase gazeuse. Dans le même ordre

d'idées, elle doit être effectuée en vase clos, et de préférence en continu plutôt que par campagnes. L'agitation ou la manipulation des milieux en phase solide ou liquide doit être réduite de façon à éviter ou à limiter au mieux la formation d'aérosols inhalables ou alvéolaires. Le recyclage des produits ne répondant pas aux critères de fabrication exigés doit également être prévu dès avant la production, et implanté ; il faut bannir tout rejet sur place ou dans l'environnement. L'automatisation et l'encoffrement, ainsi que les limitations d'accès à la zone des travailleurs non directement concernés, sont également des moyens à envisager.

- b) *Dispositifs optimisés de ventilation/filtration/évacuation des PUF* (tenant compte d'un risque de dispersion dans l'environnement). En laboratoire, la hotte à flux laminaire sera préférée à la hotte classique (manipulation plus facile, courants d'air moins accusés).
- c) *Examen critique des pratiques de travail et leur optimisation* pour réduire au mieux les risques d'exposition. Il faut reconnaître que les pratiques individuelles de travail ont une forte influence sur l'exposition, mais également qu'il convient de sensibiliser et de former chaque travailleur à veiller à sa propre sécurité, y compris par l'utilisation appropriée de dispositifs de protection individuelle (EPI) adaptés à sa physiologie chaque fois que les procédures le prévoient.
- d) *Le port des EPI* est réservé aux situations où les mesures de prévention générales sont insuffisantes ou inapplicables. Leur efficacité de protection et leurs bonnes conditions d'utilisation doivent être vérifiées en situations réelles et dans la durée (saturation, usure...). Il ne semble pas exister de données relatives à la pénétration de gants ou de vêtements protecteurs par les PUF (selon le NIOSH [2005] la norme ASTM F1661-03 recommande l'utilisation d'un bactériophage de taille 27 nm pour évaluer la possibilité d'un passage à partir de sang contaminé) ; une attention particulière sera portée aux points faibles (manches, fermetures éclair, endroits de pliures fréquentes). Pour les masques, préférer les dispositifs à apport d'air externe en raison de la facilité des PUF à passer par la moindre fuite.
- e) *Suivi régulier des conditions de travail et de l'exposition du travailleur aux PUF*, sans négliger aucune phase de travail (nettoyage, incidents, maintenance) et en tenant compte de la variabilité des conditions (entre postes, entre différentes saisons de l'année, différentes périodes ou procédés de production...). À défaut de données spécifiques applicables à des procédures de nettoyage optimisées dans le cas de PUF, appliquer les pratiques éprouvées telles que aspirateurs munis de filtres à haute efficacité, humidification des poudres dispersées et mise en œuvre de linges humides pour les ramasser. Ces actions seront effectuées en tenant compte notamment des risques d'exposition par inhalation et par contact cutané.

2.2. Risques d'incendie ou d'explosion

Il n'y a pas de données permettant de prédire le risque d'incendie ou d'explosion associé à l'utilisation de nanopoudres combustibles ; cependant, les propriétés de ces dernières pourraient impliquer un risque supérieur à celui résultant de l'utilisation d'une même quantité de poudre de granulométrie plus grossière. En effet, la diminution de la taille peut augmenter la combustibilité et la vitesse de combustion ; certains nanomatériaux conçus pour faciliter des réactions chimiques exothermiques pourraient présenter un risque d'incendie spécifique. Il est connu que le risque d'explosion de certaines poussières métalliques augmente de façon significative quand la taille des particules décroît (NIOSH, 2005).

De plus, la formation d'aérosols de PUF pourrait être plus facile que pour des particules plus grosses ; le recours à des méthodes classiques pour leur détection et quantification risque d'être totalement inadapté. Ces aérosols peuvent être absolument invisibles, au contraire de ceux de particules plus grossières de même nature (voir chapitre 2, point 3).

Le risque incendie/explosion et ses facteurs (tels que l'énergie d'inflammation, la température d'auto-inflammation, la capacité à accumuler des charges électrostatiques, la stabilité de l'aérosol dans le temps) doivent donc être abordés sous tous les angles (HSE, 2004 ; Pritchard, 2004).

En dehors des lieux de travail, cadre qui n'est pas abordé dans cet ouvrage, il est clair que les examens devront porter en priorité sur les utilisations qui impliquent la dispersion de nanoparticules, qu'elles soient relativement libres dans la formulation (par exemple crèmes solaires, dentifrices, savons) ou susceptibles d'être libérées par usure, corrosion, nettoyage ou autre opération ou dégradation normalement prévisible lors de l'utilisation ou de la fin de vie du produit fini.

Bibliographie

- HSE (2004). Nanotechnology. Horizon Scanning Information Note No HSIN1. Health and Safety Executive, 6/04 (4 pages).
- Mark D (2004). Control of nanoparticles. In: *Nanomaterials, a risk to health at work?* First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials, 12-14 October 2004, Buxton, UK. pp. 78-83.
- NIOSH (2005). http://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/nano_exchange_safety.html
- Pritchard DK (2004). "Literature Review: Explosion Hazards Associated with Nanopowders." U.K. Health & Safety Laboratory Report HSL/2004/12. London: HSE, 2004. http://www.hse.gov.uk/RESEARCH/hsl_pdf/2004/hsl04-12.pdf
- Reijnders L (2005). Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. *J Cleaner Prod* **14**(2) 124-133.
- VDI (2004). Technological analysis. Industrial application of nanomaterials – Chances and risks. Future Technologies No. 54. Düsseldorf, August 2004, ISSN 1436-5928. W Luther Ed., 112 pages.

2.3. Filtration et prévention

D. Thomas, D. Bémer

Les nanoparticules issues des processus de combustion (moteur, cigarette...) ont une très faible durée de vie. Elles présentent une forte tendance à l'agglomération, ce qui conduit à la formation d'agrégats de quelques dizaines à quelques centaines de nm, dont la capture par des médias fibreux (ou plus généralement des médias poreux) ne devrait pas poser de difficulté dès lors que leur taille est supérieure à 5-10 nm. La théorie et l'expérience s'accordent en effet pour décrire un accroissement de l'efficacité lorsque le diamètre de particule diminue jusqu'à cette limite. En deçà, les performances des médias fibreux sont moins bien établies à la fois sur le plan théorique et expérimental.

L'utilisation de filtre céramique (filtre à particules) dans l'épuration des fumées de moteurs diesels atteste de l'efficacité de cette technologie. Ainsi, dans le domaine de la protection des personnes, des lieux de travail ou de l'environnement, l'utilisation de filtres à fibres de très haute efficacité, supérieure à H12 selon la classification européenne EN 1822 (relative aux filtres à air à très haute efficacité – HEPA – et filtres à air à très faible pénétration – ULPA) ou de filtres de protection individuelle type P3, doit répondre aux attentes.

En ce qui concerne les appareils de protection respiratoire, la théorie prévoit une pénétration de l'aérosol ultra-fin par des fuites faciales moindre que celle d'un gaz ou de l'aérosol test de NaCl à 600 nm préconisé par la norme. Là encore, des confirmations expérimentales seraient nécessaires.

Bien que l'efficacité de capture par les fibres soit gouvernée par la diffusion brownienne (voir chapitre 1, point 3) de sorte que l'efficacité augmente lorsque la taille de la particule diminue, il est légitime de s'interroger sur l'efficacité de filtration pour des particules inférieures à 5-10 nm compte tenu du faible nombre d'études sur le sujet et de leurs conclusions parfois contradictoires. Dès lors, pour ces aérosols dont l'existence dans l'air des lieux de travail reste encore à établir précisément, l'efficacité des systèmes de protection classique (confinement des lieux de fabrication et de manipulation de ces produits, appareils respiratoires isolants, épurateurs) n'est pas garantie. Les dispositions à prendre pour la protection vis-à-vis de ces polluants ne sont à ce jour pas bien définies.

2.4. Valeurs limites d'exposition professionnelle

B. Hervé-Bazin

Puisque les dangers des PUF sont reconnus, il faut limiter le risque dans la mesure du « raisonnablement possible » et donc réduire les expositions. La fixation de valeurs limites poursuit cet objectif dans le domaine environnemental, il reste à le promouvoir dans le domaine professionnel.

On désigne par le terme générique de « valeur limite d'exposition professionnelle » (VLEP) une concentration qui ne devrait pas être dépassée dans l'air inhalé par un travailleur, soit à court terme (c'est-à-dire pendant un temps qui ne dépasse pas 15 minutes ; on parle alors de VLE) pour protéger d'effets aigus, soit à long terme (on parle dans ce cas de VME) pour éviter des effets qui pourraient être entraînés par des expositions répétées sur l'ensemble de la vie professionnelle. La « période de référence » (durée sur laquelle est évaluée la concentration moyenne d'exposition dans l'atmosphère inhalée par le travailleur) porte alors généralement sur huit heures. Pour la plupart des substances listées, il existe à la fois une VLE et une VME. Pour une présentation d'ensemble du sujet, voir le site Internet de l'INRS (<http://www.inrs.fr/>) ; rappelons seulement que les VLEP sont un outil très utile à la prévention des risques professionnels dus aux substances chimiques, notamment en donnant des repères objectifs et chiffrés pour la gestion des risques. Cette utilité est telle que, d'une part, les pays développés se sont dotés, certains depuis plusieurs dizaines d'années, de systèmes propres de valeurs limites et que, d'autre part, des besoins d'harmonisation sont ressentis tant pour éviter des distorsions trop marquées d'interprétations de données en principe communes, que pour limiter la multiplication de travaux redondants dans divers pays. Il reste toutefois un travail considérable à accomplir sur ce dernier point.

Cette partie rappelle les mesures adoptées dans le domaine environnemental avant d'initier une réflexion dans le domaine professionnel.

2.4.1. Intérêt et limites de valeurs limites environnementales

| Réalité et importance du rôle des PUF de l'environnement dans les effets sur la santé

Le Committee on the Medical Effects of Air Pollutants (COMEAP) est un groupe de travail consultatif (Angleterre) sur les dangers pour la santé humaine de la pollution environnementale. Pour ce comité (COMEAP, 1995), de nombreuses études épidémiologiques ont observé des relations entre variations quotidiennes de la concentration particulaire et effets aigus sur la santé tels que excès de décès, augmentation des admissions à l'hôpital de personnes souffrant de problèmes cardiaques ou respiratoires, aggravation des symptômes chez les asthmatiques. La question est de savoir s'il y a bien relation de cause à effet, ce que semble montrer la remarquable cohérence des symptômes et de leur gravité entre des études très diverses menées en de nombreux lieux différents, avec différentes sources polluantes et différents indicateurs de l'état de santé. Le COMEAP (1995) considère que les éléments en faveur d'un lien de causalité sont tels qu'il faut conclure à l'existence d'un lien réel, ne résultant ni d'un artefact technique

ni de l'influence d'un facteur de confusion ; selon cet organisme, il serait imprudent de ne pas considérer ces relations comme causales. Il subsiste toutefois une difficulté majeure, celle de la non-identification d'un mécanisme d'action. D'une part la masse d'aérosol associée aux effets observés est très faible, et le fait que des effets semblables aient été rapportés dans des lieux aux caractéristiques de pollution différentes peut indiquer qu'il s'agit d'un effet non spécifique ; d'autre part, des effets différents peuvent être liés à des constituants différents des particules. Pour le COMEAP (1995), il n'est donc pas strictement démontré que les particules ultra-fines jouent un rôle dans ces effets adverses.

Pour ce qui est des effets à long terme, le COMEAP (1995) considère que les éléments de preuve sont moins forts. La possibilité de l'intervention de facteurs de confusion dans des études épidémiologiques est très grande, et il est difficile d'évaluer l'exposition individuelle sur les durées correspondantes. Malgré ces difficultés et limites, le COMEAP recommande de considérer également ces associations comme causales.

Bien qu'émis huit années après l'avis du COMEAP (1995) et largement à la fois plus informé et plus nuancé sur quelques points, l'avis de l'EPA (2003) est identique sur le fond. Cette administration considère que les données acquises dans cet intervalle « confortent les associations » faites entre concentrations particulaires environnementales et admissions hospitalières, même si les méthodes de dépouillement statistique de séries de données et de traitement des multiples facteurs de confusion possibles ne sont pas encore totalement satisfaisantes (voir chapitre 4, point 2).

Beaucoup soutiennent cette hypothèse d'un lien de cause à effet. Les principaux arguments ont été résumés ainsi par Filleul et coll. (2003) :

- si les risques relatifs observés sont tous faibles, ils sont raisonnablement observables du fait de la taille de la population exposée ; par ailleurs, un lien faible ne dénie pas par lui-même un lien de causalité ;
- les résultats sont constants, quels que soient le lieu de réalisation de l'étude et les méthodes utilisées (séries temporelles, panels, case-crossover) ;
- l'argument de spécificité des associations ne peut être exagéré, les manifestations sanitaires observées étant multifactorielles ;
- les manifestations relevées ont bien lieu après les épisodes de pollution ; la recherche d'effets paradoxaux (symptômes précédant l'épisode de pollution) s'est révélée négative. Schwartz (2000b) a montré que le risque lié à une journée d'exposition à la pollution atmosphérique sur la mortalité persiste jusqu'au cinquième jour ;
- si l'utilisation de modèles additifs généralisés a pu entraîner une certaine surestimation du risque, cela n'affecte pas les résultats des études européennes en raison d'une stratégie de modélisation différente ;

- il existe de nombreux éléments en faveur de la plausibilité biologique, notamment dans le domaine des effets cardiovasculaires et respiratoires (travaux *in vitro*, chez l'animal, observations chez l'homme ; voir Kreyling et coll., 2004) ;
- les résultats sont globalement cohérents : risques plus élevés lorsqu'ils concernent des pathologies plus spécifiques ou des sous-groupes *a priori* plus sensibles, liens en relation logique avec certaines propriétés physicochimiques (par exemple risques plus élevés pour les PM_{2,5} en raison de leur pénétration plus profonde dans l'arbre bronchique), résultats observés sur les risques à long terme supérieurs aux risques à court terme, diminution des effets observés lors de baisses de pollution.

La causalité, concluent Filleul et coll., est actuellement l'hypothèse la plus plausible, ce qui ne veut pas dire que les connaissances ne doivent pas être encore approfondies.

Des travaux complémentaires mettent en évidence des effets de la pollution particulaire urbaine (remodelages de parois de petites voies respiratoires, atteintes de l'épithélium nasal), que ce soit sur des personnes fortement exposées (par exemple, à Mexico, 20 femmes [Churg et coll., 2003], ainsi que des enfants [Calderon-Garcidueñas et coll., 2003b]), sur des chiens (Calderon-Garcidueñas et coll., 2003a), ou *in vitro* sur des explants de trachées de rats (Dai et coll., 2003). Cette pollution pourrait, par ailleurs, contribuer à altérer le transport mucociliaire et donc la fonction d'épuration (Calderon-Garcidueñas et coll., 2003a ; Riechelmann et coll., 2003).

Des publications confirment les effets des aérosols urbains sur le système cardiovasculaire, notamment des personnes âgées, et sur les indicateurs hématologiques (Devlin et coll., 2003 ; Ghio et coll., 2003 ; de Hartog et coll., 2003), avec apparemment des différences entre particules ultra-fines, fines, ou « grossières » (Gong et coll., 2003 ; de Hartog et coll., 2003 ; Timblin et coll., 2002).

Les réserves critiques (voir chapitre 4, point 2) sont moins nombreuses (Green et coll., 2002 ; Moolgavkar, 2005). Pour Moolgavkar (2005), elles sont principalement les suivantes :

- les études épidémiologiques de type écologique ne sont pas adaptées à la détection de risques relatifs faibles (inférieurs à 2). Dans ce dernier cas, des facteurs de confusion non détectés ou non pris en compte peuvent fausser totalement les résultats ;
- les facteurs de confusion possibles sont nombreux, et même ceux repérés ne sont pas toujours pris en compte, notamment les facteurs saisonniers (les caractéristiques de la pollution varient en fonction de la saison), ceux relatifs à la population (évolutive au fil des ans), les facteurs locaux (caractéristiques locales de la pollution) et, plus encore, la présence de co-polluants (ignorés ou traités comme s'ils étaient présents isolément) ;

- les données sont très hétérogènes (et cependant agrégées), et seules les plus « saillantes » retenues, ce qui a pu mener à des résultats invraisemblables, ou à ne pas retenir des polluants pourtant statistiquement plus fortement liés aux effets sur la santé (par exemple SO₂, O₃, NO₂, suivant les villes ou les saisons) ;
- les méthodes d'établissement et/ou de dépouillement des données sont critiquables. Ceci concerne notamment le choix du modèle (il est vrai qu'on ne sait pas quel modèle serait valide du point de vue biologique, puisqu'on ignore les mécanismes en jeu).

Moolgavkar conclut :

- il serait plus avisé de chercher à comprendre les sources de l'hétérogénéité que d'essayer d'évaluer le risque par un coefficient unique doté d'un intervalle de confiance réduit trompeur, et pour lequel on n'a pas d'interprétation claire ;
- on ne devrait pas établir de normes pour des polluants pour lesquels un lien de causalité n'est pas réellement établi. En présence d'un risque insuffisamment compris, mieux vaudrait se prévaloir du principe de précaution et agir, par exemple, sur la pollution par les particules fines, dans la mesure où cela ne mènerait pas à augmenter la concentration en nombre des particules ultra-fines.

Les arguments de Moolgavkar (2005), entièrement recevables, ne nient pas le risque en soi ; ils critiquent plutôt les méthodologies, et les interprétations biaisées qui peuvent en résulter. Ils visent par ailleurs les études épidémiologiques, et non les études expérimentales, lesquelles apportent d'autres éléments confirmant les effets possibles de certains polluants ou mélanges.

| Facteurs étiologiques évoqués dans les effets des PUF de l'environnement sur la santé

a) Aperçu sur la composition des aérosols solides urbains (Expert Panel on Air Quality Standards, 2001)

Les principaux constituants solides des aérosols urbains sont (voir chapitre 1, point 2) :

- les sulfates (principalement sulfate d'ammonium), originaire du dioxyde de soufre *via* l'acide sulfurique ;
- les nitrates (principalement nitrate d'ammonium), provenant des oxydes d'azote, *via* l'acide nitrique ;
- l'ion ammonium, venant essentiellement des émissions d'ammoniac (agriculture, notamment) ;

- la matière carbonée (suies de combustion) associée à de la matière organique, formée secondairement par oxydation photochimique de composés organiques volatils, et adsorption sur les suies des composés formés ;
- sels de sodium et de magnésium, provenant des embruns (et du salage des routes en hiver) ;
- sels de calcium et de potassium, d'origine tellurique (essentiellement par remise en suspension des poussières par le vent) ;
- l'ion chlorure est principalement associé au sodium (sel de la mer, salage des routes), mais peut provenir de l'acide chlorhydrique (combustion du charbon, usines d'incinération) ;
- minéraux insolubles, comme des argiles issus des sols (poussières de surface) ;
- matériaux biologiques (bactéries, spores, pollens, fragments de feuilles, etc.).

Il y a une différence notable de composition entre les particules grossières et les fines (prédominance de matière carbonée, de sulfate d'ammonium et de nitrate d'ammonium). Seul le fer représente une proportion notable de la masse des PM_{10} (ordre de grandeur $0,3$ à $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$) ; le second métal en importance est le zinc (ordre de grandeur $0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Si le fer est largement d'origine tellurique (et donc surtout présent dans les particules grossières), les autres métaux proviennent d'activités comme fonderie ou incinération (particules fines, par conséquent). Le charbon et le fuel lourd contiennent aussi des traces de métaux dont une partie passe dans l'atmosphère lors de la combustion.

Ces aérosols peuvent contenir bien d'autres constituants, certains importants par eux-mêmes, comme les hydrocarbures polycycliques aromatiques ou les hopanes et stérènes (McDonald et coll., 2004), ou encore des constituants organiques formés secondairement.

b) Parmi les facteurs cités par l'EPA (EPA, 2003) comme susceptibles d'être en lien avec les effets des particules environnementales sur la santé, on trouve :

- les métaux (de transition) solubles, notamment dans le cas des cendres volantes de combustion d'huiles usées (*Residual Oil Fly Ashes*, ROFA), même s'il est parfois difficile d'individualiser les effets d'un métal par rapport à un autre ; il n'est pas définitivement établi que les faibles quantités de métaux associées aux particules suffisent à expliquer les effets observés. Il ne peut être affirmé que les métaux sont les seuls ou même les principaux agents toxiques ;
- les particules diesels, pour lesquelles les indications qu'elles renforcent les réponses allergiques s'accumulent (voir chapitre 6, point 2) ; on ignore cependant si d'autres types de particules environnementales ont des effets similaires ;

- les PUF, qui provoquent, à masse égale, une réponse inflammatoire supérieure à celles de particules fines de même composition ; la surface totale des particules pourrait être un paramètre pertinent ;
- la composition des particules peut jouer un rôle majeur dans la toxicité des aérosols environnementaux, comme le montrent les études réalisées à partir de tels aérosols concentrés.

c) Plusieurs publications n'omettent pas de rappeler le rôle des endotoxines dans certains effets de PUF environnementales (par exemple Arimoto et coll., 2005 ; Schins et coll., 2004 ; Becker et coll., 2003 ; Monn et coll., 2003). On peut également trouver des endotoxines dans de nombreux milieux de travail (porcheries, travail du coton, par exemple ; voir Liebers et coll., 2006) ; il serait donc logique d'envisager de fixer une valeur limite d'exposition professionnelle pour ces agents, comme l'ont proposé Heederik et Douwes (1997) ou encore Donham et coll. (2000).

d) Si l'approche du SCENIHR (2005) est, comme beaucoup d'autres, centrée sur le rôle possible de la composante particulaire de la pollution environnementale, il ne faut pas oublier que les polluants gazeux peuvent également exercer un effet propre (par exemple, le rôle potentiel du dioxyde de soufre : Sunyer et coll., 2003a, 2003b). Il n'est généralement pas possible de le distinguer aisément en raison des fortes corrélations souvent observées entre polluants particulaires et gazeux, la majeure partie de ces derniers ayant la même origine anthropique (circulation routière, essentiellement ; Cyrus et coll., 2003 ; Sarnat et coll., 2001).

Il semble cependant que, globalement, la responsabilité des aérosols dans les effets sur l'homme de la pollution environnementale soit reconnue comme prépondérante, voire unique, la toxicité des polluants gazeux paraissant douteuse aux concentrations mesurées (Sunyer et coll., 2003a ; Sarnat et coll., 2001 ; Sunyer et Basagana, 2001 ; Schwartz, 2000a ; Wichmann et coll., 2000), sauf sans doute pour l'ozone (Bell et coll., 2004 ; Schwartz, 2005 ; Levy et coll., 2005), encore qu'une certaine accoutumance puisse sembler en tempérer les effets (Gong et coll., 1997 ; Jorres et coll., 2000), et qu'une preuve définitive de son rôle effectif soit difficile à objectiver (voir le volume 16(4), pp. 427-467, de la revue *Epidemiology* (juillet 2005), rapportant trois méta-analyses et proposant d'intéressants commentaires).

| Groupes à risque dans la population générale

Morawska et coll. (2004) rappellent que sont identifiés comme plus sensibles aux effets potentiels des particules environnementales :

- les personnes ayant des maladies respiratoires (bronchite chronique obstructive, bronchite aiguë) ou cardiovasculaires présentent plus de risques de décès prématuré ou d'hospitalisation ;
- les personnes affectées de maladies respiratoires infectieuses (par exemple pneumonie) ont également des risques plus élevés de décès prématuré ou de morbidité (hospitalisation, aggravation des symptômes respiratoires). Par ailleurs, l'exposition aux particules peut accroître la susceptibilité individuelle aux infections respiratoires ;
- les personnes âgées présentent plus de risques de décès prématuré ou d'hospitalisation pour problèmes cardiopulmonaires ;
- les enfants présentent un risque accru de symptômes respiratoires et de diminution de la fonction respiratoire ;
- les asthmatiques présentent un risque d'exacerbation des symptômes et un besoin accru de soins médicaux.

À noter que, dans cette énumération, la population des diabétiques a été oubliée (Zanobetti et Schwartz, 2002). Cette dernière est néanmoins importante, notamment du fait de la relative banalisation de l'obésité (états prédiabétiques, diabète de type 2). Une prédisposition génétique au développement d'une atteinte coronarienne a également été mise en évidence chez une proportion notable (environ 15 %) de blancs de type caucasien (Lee et coll., 2006).

Certains de ces groupes peuvent être représentés en milieu de travail, et il convient d'y porter d'autant plus d'attention que certaines pathologies peuvent augmenter l'importance du dépôt pulmonaire des PUF par rapport aux bien-portants (Chalupa et coll., 2004). Cependant, selon l'American Thoracic Society (1999), l'examen des débats du Congrès des États-Unis montre que ses intentions étaient de protéger non seulement la population générale, mais également les sous-groupes plus sensibles à la pollution, y compris les asthmatiques ou les personnes atteintes de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).

| Définitions de valeurs limites visant à protéger la population générale des effets des PUF

Dans un essai de qualification globale de la pollution environnementale en lien avec ses effets apparents, le COMEAP (1998) a proposé de délimiter les domaines suivants :

- inférieure à $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (moyenne mobile sur 24 heures) : « faibles » niveaux de pollution ;
- entre 50 et $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$: pollution « modérée » ;

- entre 75 et 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$: pollution « élevée » ;
- plus de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$: pollution « très élevée ».

Ces valeurs sont d'une certaine manière arbitraires car introduisant des distinctions dans un continuum. Par ailleurs, aux niveaux de pollution « très élevés », la grande majorité des exposés ne ressentira aucun effet. Vu l'évolution très rapide des connaissances, ces domaines pourraient être redéfinis.

S'appuyant sur les résultats des études épidémiologiques, conduites dans des contextes très variés et au sein de populations différentes dans diverses parties du monde, la Communauté européenne (CE, 1999) a défini pour les PM_{10} les limites suivantes, qualifiées d'exigences minimales, applicables à compter du 1^{er} janvier 2005 :

- 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne sur 24 heures, à ne pas dépasser plus de 35 fois par an ;
- 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne annuelle.

Ces valeurs deviendraient respectivement (sous réserve de confirmation) 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ à ne pas dépasser plus de 7 fois par an, et 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, à compter du 1^{er} janvier 2010.

Ces décisions ne concernent à proprement parler que les PM_{10} , particules dites « grossières » mais dont la définition inclut également les particules fines ($\text{PM}_{2,5}$) et ultra-fines ($\text{PM}_{0,1}$). Sans exclure le rôle des PM_{10} , généralement reconnu (voir, entre autres : Chen et coll., 2005 ; Bateson et Schwartz, 2004 ; Englert, 2004 ; Schwartz, 2004a, 2004b), plusieurs études épidémiologiques tendent à montrer que les particules fines et/ou ultra-fines joueraient également un rôle propre dans les atteintes à la santé publique (par exemple : Krewski et coll., 2005 ; Kappos et coll., 2004 ; Mar et coll., 2004 ; Pope et coll., 2004 ; Schwartz et Neas, 2000). Ceci est reflété par exemple dans les évolutions des positions de l'EPA. En effet, cette dernière (EPA, 2003) a défini des normes relatives aux particules environnementales (NAAQS, *National Ambient Air Quality Standards*) dès 1971, visant les « particules totales » (*Total Suspended Particulates*, TSP ; tailles nominales de 25 à 45 μm). En 1987, elle a introduit les PM_{10} (particules dont le diamètre aérodynamique médian est inférieur à 10 μm), et fixé la norme visant à protéger des effets sur la santé humaine (*primary standard*, complété par un *secondary standard* destiné à protéger l'environnement au sens large, non présenté ici) à 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (en moyenne sur 24 heures), à ne pas dépasser plus d'une fois par année. Une troisième révision fut publiée, après trois années de discussions, en juillet 1997, s'appuyant sur les résultats d'études épidémiologiques reliant concentrations des aérosols et effets sur la santé, et introduisant les $\text{PM}_{2,5}$ (particules de diamètre aérodynamique médian inférieur à 2,5 μm , dites « fines »), qui devaient faire l'objet d'un suivi spécifique. Pour ces dernières, une norme de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ était fixée en moyenne annuelle (moyenne sur trois années des moyennes arithmétiques annuelles) et une autre, de 65 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne sur 24 heures (moyenne sur trois années des 98^e percentiles des $\text{PM}_{2,5}$ sur 24 heures). Le suivi des particules grossières était prolongé avec la même

norme de $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$, fondée cette fois sur le 99^e percentile des PM_{10} sur 24 heures, et par une norme de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne annuelle.

Ces décisions ne répondaient certes pas à toutes les difficultés et incertitudes, ainsi que l'ont détaillé McClellan et Miller (1997) ; c'est sans doute l'une des raisons pour lesquelles elles furent attaquées en justice ; après plusieurs procès et jugements sur différents aspects juridiques (notamment sur un possible excès de pouvoir administratif de l'EPA, finalement rejeté), la cour d'appel a estimé que ces normes n'étaient « ni arbitraires ni le fait d'un caprice », et donc confirmé leur validité.

Parallèlement, dès janvier 1998, le Conseil national de la recherche (*National Research Council*) entreprenait la définition d'un programme coordonné de recherches selon six axes, parmi lesquels la caractérisation de l'exposition humaine en fonction de l'activité et du micro-environnement (à l'intérieur des bâtiments), l'étude des dépôts des particules dans les voies respiratoires, de leur redistribution et effets systémiques, celle des mécanismes d'attaque et de défense de l'organisme, ou encore celle de la réponse humaine, déduite de l'expérimentation ou observée par épidémiologie. Ces orientations se sont traduites par la révision des ouvrages publiés par l'EPA en 1996, les nouvelles versions (juin 2003) devant aboutir à terme à une révision des normes, reposant sur des fondements scientifiques toujours mieux établis.

Dans sa discussion relative à la définition de normes relatives aux valeurs limites pour la pollution particulaire environnementale, l'EPA (2003) :

- considère que les données permettent de confirmer que les fractions grossière et fine doivent être prises en compte séparément ; elles constituent des entités distinctes (mécanismes de formation, composition chimique, temps de résidence atmosphérique, comportement atmosphérique, profil d'exposition pour l'homme différent). Les stratégies d'échantillonnage sont également différentes ;
- relève que diverses études épidémiologiques ont impliqué divers constituants de la pollution particulaire (comme les sulfates, nitrates, le carbone, des composés organiques, des métaux) dans les effets sur la santé ; il pourrait y avoir des effets indépendants pour les particules fines ou ultra-fines. Les associations sont généralement rapportées avec des particules issues de combustion, mais pas avec des particules telluriques ;
- estime que la diversité des effets attribués aux aérosols et des mécanismes envisagés ne plaide pas en faveur de la mise en cause d'un composant unique ;
- pense qu'il est cependant probable que certains constituants déterminés sont plus étroitement liés à un effet donné, d'où une importante incertitude dans l'interprétation des données épidémiologiques observant des réponses biologiques différentes pour des expositions à des mélanges différents ; de plus, il peut exister des différences entre populations examinées (facteurs sociodémographiques, états de

santé, degré d'activité en plein air ou en intérieur, alimentation, accès aux soins médicaux, exposition à d'autres facteurs de risque ; etc.).

Au vu de l'ensemble de ces éléments, l'EPA (2003) conclut :

- le recours au paramètre global masse reste pertinent pour définir des normes PM_{10} et $PM_{2,5}$;
- la coupure entre fractions granulométriques grossière et fine se trouvant entre 1 et $3\text{ }\mu\text{m}$, en l'absence d'éléments nouveaux indiquant la nécessité d'une évolution, l'EPA confirme la valeur de $2,5\text{ }\mu\text{m}$;
- l'évolution la plus logique serait de retenir les fractions séparées, $PM_{10-2,5}$ et $PM_{2,5}$, la fraction PM_{10} étant moins appropriée car incluant les particules fines.

En janvier 2005, les scientifiques de l'EPA ont recommandé, pour les $PM_{2,5}$, d'abaisser la valeur moyenne annuelle de 15 à 12 à $14\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ et la valeur moyenne quotidienne de 65 à 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Kaiser, 2005). En décembre 2005 (date limite fixée par décision de justice), l'EPA a proposé de réduire cette dernière à 35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et la norme PM_{10} (24 h) de 150 à 70 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, sans modifier les autres valeurs. Après examen de commentaires et auditions publiques, l'EPA finalisera ses propositions fin septembre 2006 ; elles entreraient en vigueur en 2015. Ces propositions, qui ne respectent pas les recommandations du Comité scientifique de suivi, ont déjà été contestées comme insuffisamment prudentes (Rom et Samet, 2006).

En conclusion, nombre d'instances de haut niveau, nationales et internationales, ont considéré que les éléments permettant d'incriminer, de façon certaine et plus ou moins exclusive, les particules fines et/ou ultra-fines de l'environnement dans la genèse ou l'aggravation de divers troubles de santé publique menaient à définir des valeurs limites destinées à protéger la population générale :

- a) ces particules jouent indiscutablement un rôle dans ces effets, même si elles ne sont sans doute pas le seul facteur ; des effets faibles peuvent se traduire globalement par un nombre important de cas puisqu'ils concernent la population générale ;
- b) leur diversité de natures implique un mécanisme non spécifique, que l'on pourrait qualifier « d'effet particule » (fine ou ultra-fine) ; par ailleurs plusieurs agents étiologiques possibles ont été évoqués ;
- c) la diversité des groupes à risque et le nombre élevé de personnes correspondant (enfants, personnes âgées, malades), la variété des effets (pulmonaires, cardiovasculaires) et des facteurs étiologiques possibles (noyau carboné, substances adsorbées, métaux de transition), obligent à définir des valeurs basses, d'autant plus que la diversité et l'hétérogénéité de ces facteurs et des groupes à risque impliquent le masquage d'éventuels effets de seuil.

Or ces considérations s'appliquent également à la population des travailleurs, même si divers éléments peuvent modifier et les conclusions et la manière d'y parvenir. Parmi eux : les aérosols de PUF industriels sont de natures différentes ; les concentrations d'exposition attendues ou observées sont nettement plus élevées ; les groupes à risque sont moins nombreux et normalement moins sensibles. Mais non seulement ceci n'empêche pas de conclure à la nécessité de définir des valeurs limites en milieu professionnel, mais encore incite à engager dès maintenant les recherches et les réflexions pour y parvenir le plus rapidement possible (voir SCENIHR, 2005, pp. 41, 60).

2.4.2. Réflexions et propositions relatives au domaine professionnel

| Réalité et importance du rôle des PUF en milieux de travail

Les chapitres 4, 5 et 6 de cet ouvrage sont en grande partie consacrés à établir la réalité et l'importance du rôle potentiel des PUF dans l'hygiène et la sécurité des milieux de travail. Rappelons ici que des travaux expérimentaux montrent également l'existence d'un « effet particule ultra-fine », le rôle étiologique possible de nombreux facteurs et paramètres (nombre de particules, surface, molécules adsorbées, présence de métaux de transition, formation de radicaux libres), ainsi qu'une diversité d'effets physiologiques (pulmonaires, cardiovasculaires). Ils montrent par surcroît une diffusion des PUF dans l'ensemble de l'organisme, au moins dans les organes les plus perfusés (poumon, cœur, foie, reins, cerveau), ce qui peut faire craindre une accumulation et l'apparition d'effets à long terme.

Deux difficultés semblent plus accusées dans le monde du travail :

- celle de l'immense diversité potentielle de nature chimique des PUF, avec pour conséquence prévisible une diversité plus marquée des organes cibles ou effets potentiels, dont certains sans doute encore non caractérisés (par exemple hépatiques, rénaux, cérébraux ; voir Kreyling et coll., 2002) ;
- celle d'expositions à la fois plus univoques et plus élevées.

Ces deux difficultés jouent dans le sens de rendre plus difficile l'acceptation de VLEP génériques « particules ultra-fines », dans la mesure où la spécificité et la diversité des conditions d'exposition peuvent faire ressentir comme inappropriée leur élaboration. Il n'en reste pas moins vrai qu'existe un « effet particules fines » et que des dispositions générales de prévention doivent être prises à cet égard, dont l'une est la fixation de valeurs limites visant à éviter les dérives et à fournir des repères chiffrés nécessaires à la gestion du risque.

| Publications relatives aux PUF et aux VLEP

Seules deux publications expérimentales traitent explicitement à la fois de PUF et de VLEP.

Lam et coll. (1988) ont exposé des cobayes Hartley mâles à du ZnO ultra-fin fraîchement formé, avec ou sans pic de concentration (concentration moyenne $7 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, 3 heures par jour, 5 jours) et constaté la décroissance progressive de la capacité pulmonaire totale (-18 % sur les 5 jours) et de la capacité vitale (-22 %), avec formation d'œdèmes pulmonaires. Les pics d'exposition provoquaient une chute brutale de la capacité pulmonaire, chute plus importante qu'en leur absence. Les auteurs concluent que la valeur limite actuelle (pour ZnO non ultra-fin) pourrait ne pas protéger les travailleurs (d'effets induits par du ZnO ultra-fin ; voir chapitre 5, point 1).

Serita et coll. (1999) ont exposé des rats (exposition unique de 5 heures) à des concentrations de 0,15, 1,14 ou $2,53 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ de particules ultra-fines de nickel (métal), et sacrifié 5 rats par groupe, soit immédiatement soit 1, 3, 7, 14 ou 21 jours après. La demi-vie pulmonaire moyenne du nickel était de 32 jours, indépendante de la dose. Les examens révélaient un accroissement significatif du poids des poumons, une accumulation et une certaine dégénérescence de macrophages (lipoprotéinoïse alvéolaire). Les auteurs concluent que même une inhalation unique de nickel ultra-fin induit des lésions pulmonaires à des doses comparables à la VLEP japonaise ($1 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ en Ni).

Ces publications n'apportent pas d'élément exploitable dans le sens de la fixation de VLEP génériques à des PUF. Elles apportent toutefois des confirmations d'effets pulmonaires plus accusés avec des PUF qu'avec des aérosols plus grossiers, à concentrations massiques égales ; d'autres publications, n'abordant pas explicitement l'aspect valeurs limites, montrent que la nature de la substance peut aussi être un paramètre déterminant de sa toxicité (Toya et coll., 1997 ; Kuschner et coll., 1997 ; Zhang et coll., 1998).

| Quelques indications sur la fixation ou non de valeurs limites

Dans un document de travail non publié, Muhle (1993) soulignait qu'une VME de $0,8 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ (relative à la fraction alvéolaire), calculée par lui-même pour l'homme au travail par extrapolation à partir de données expérimentales, n'est pas applicable aux PUF de substances naguère dites « gênantes » (*nuisance dusts*). Il rappelait qu'il a été montré que de telles particules présentent, à masse égale, une toxicité pulmonaire significativement supérieure aux plus grosses de même composition chimique (Ferin et coll., 1992 ; Oberdörster et coll., 1994). Prenant en compte une plus grande surface spécifique, la VLEP applicable à des PUF alvéolaires de TiO_2 serait, selon lui, de $0,4 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$; la

valeur serait inférieure pour d'autres PUF, telles que les particules diesels. Partant des mêmes données expérimentales, la Xerox Corporation a, aux États-Unis, abaissé sa valeur interne d'exposition aux poussières alvéolaires (poussières de toner) à $0,4 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ (Mermelstein et coll., 1990). Mermelstein et coll. (1994) estimaient, pour leur part, que l'interprétation rigoureuse des données devait mener à conclure en faveur d'une valeur de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$. Les expérimentations avaient été réalisées avec un toner spécialement enrichi en particules fines (environ 35 % de particules alvéolaires, à comparer avec environ 4 % pour un toner usuel) ; une valeur adaptée à des PUF devrait donc être inférieure à $200 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$.

Il faut rappeler que ces valeurs visent à éviter la diminution de la clairance pulmonaire.

L'ACGIH (2001) considère que les données sont insuffisantes pour déterminer une valeur limite spécifique pour les PUF ; les valeurs de $3 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ou $10 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, qui visent les fractions conventionnelles respectivement alvéolaire ou inhalable, ne conviennent pas. L'ACGIH recommande la maîtrise des expositions aux PUF, particulièrement pour les individus aux fonctions pulmonaires altérées, de manière à minimiser le risque de surcharge pulmonaire volumétrique.

Un faisceau d'arguments indique par ailleurs que, pour des PUF, il serait préférable de fixer des valeurs limites soit en nombre de particules, soit en surface totale. La mesure de ce dernier paramètre n'est pas encore applicable en routine ; des données d'exposition en nombre en situations réelles peuvent aider à évaluer quel pourrait être l'ordre de grandeur d'une valeur à ne pas dépasser (voir chapitre 2, point 3).

Une valeur limite à court terme (VLE) devrait être définie pour protéger les travailleurs de pics de concentration trop marqués, même si la valeur moyenne se trouvait respectée. En effet, les travaux notamment d'Oberdörster et coll. (Ferin et coll., 1992) et de Hahn et coll. (2005) ont montré que l'interstitialisation dans le tissu épithélial pulmonaire et, par voie de conséquence, l'allongement de la biopersistance et le ralentissement de la clairance (avec accroissement correspondant de la probabilité d'effet nocif à long terme), dépendait à la fois de la dose et de sa vitesse d'administration. Hahn et coll. (2005) ont ainsi montré qu'un pic d'exposition durant deux jours après une exposition de quinze jours à niveau constant provoquait une inflammation pulmonaire supérieure à celle découlant du niveau constant ; cette expérimentation a été conçue en fonction des observations épidémiologiques montrant que le nombre des décès et admissions à l'hôpital est associé à des pics de concentration d'aérosols.

| De l'existence ou non d'un seuil d'effet

Selon l'OMS (2004), des simulations mathématiques ont montré que la sommation sur un nombre croissant de courbes de réponse individuelles comportant un seuil de réponse fait progressivement disparaître tout seuil pour laisser place à une réponse de type

linéaire. En d'autres termes, plus les caractéristiques des personnes exposées sont variées, plus les modalités d'exposition sont diverses, et plus on inclut des groupes de susceptibilités différentes (comme enfants ou personnes âgées), plus les seuils peuvent devenir indiscernables et finir par disparaître. Rappelons au passage que chaque seuil est naturellement lié à l'effet considéré ; il dépend également de la population étudiée (exemple : groupes sensibles ou fragilisés). L'OMS (2004) consacre une longue discussion à cette question de la détection d'un seuil pour faire comprendre pourquoi on n'observe généralement pas de seuil d'effet dans les études de ce type. La pratique semble confirmer ce point de vue (Samoli et coll., 2005 ; Kappos et coll., 2004).

| Le problème de la métrique

Les normes environnementales évoquées plus haut sont des normes massiques ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). Or une norme massique n'est pas ce qu'il y a de plus indiqué pour des PUF, dont le nombre et la surface totale deviennent des paramètres plus déterminants lorsque la taille diminue (Brouwer et coll., 2004). S'il fallait envisager de définir des normes à respecter pour limiter les effets potentiels sur la santé des PUF, comme cela a été fait dans le domaine environnemental, il serait préférable que ces normes soient définies en nombre de particules ou en surface totale, et non (seulement) en masse.

Il est également clair que des stratégies d'échantillonnage adaptées aux caractéristiques des milieux de travail doivent être appliquées (Brouwer et coll., 2004).

Il faut aussi prendre conscience que, comme l'ont montré Ramachandran et coll. (2005) pour les particules diesel, la définition de groupes d'exposition peut différer selon le type de métrique utilisé (concentrations en masse, nombre, ou surface) ; la durée de mesurage peut également influencer sur le classement de l'exposition (en particulier si la variabilité est élevée). Par ailleurs, contrairement à la concentration en masse, la concentration en nombre peut être rapidement modifiée dans le temps par différents mécanismes (nucléation, coagulation ; Kittelson, 1998) ou des interférences difficiles à éviter (par exemple fumée de tabac, engin à moteur à proximité). Ces remarques soulignent la prudence et les progrès nécessaires pour objectiver des valeurs limites pertinentes, ainsi que le caractère possiblement provisoire de choix qui pourraient être faits.

| Conclusion

- La définition de valeurs limites destinées à protéger la population générale d'effets négatifs sur la santé attribués au moins pour partie aux particules fines ou ultra-fines de la pollution environnementale devrait amener, en toute logique, à envisager de faire de même pour les travailleurs professionnellement exposés à des PUF. Ces derniers sont en effet également exposés à une pollution spécifique qui

peut, de plus, être significativement plus importante, et correspondre à des polluants très différents présentant des propriétés toxicologiques plus marquées ou encore insuffisamment connues.

- Si les groupes à risque sont *a priori* moins fournis et moins diversifiés dans la population des travailleurs (absence de jeunes ou très jeunes, de malades, de personnes âgées), tous ne peuvent cependant être considérés comme en parfaite santé (personnes allergiques, aux fonctions respiratoires diminuées, ou encore présentant des problèmes cardiovasculaires). Ces personnes relativement fragilisées sont justement celles qui risquent d'être les plus sensibles aux effets potentiels d'une pollution par des PUF, et il convient de ne pas l'oublier lors de l'établissement de valeurs limites.
- Des valeurs limites génériques pour les PUF ne devraient pas être considérées comme réglant *a priori* toutes les situations. En effet, on sait déjà que certains types de PUF – par exemple les nanotubes de carbone (voir chapitre 6, point 4) – justifieraient des mesures spécifiques plus sévères en raison de leurs propriétés toxicologiques particulières.
- Une ou des valeurs limites devraient être définies pour les endotoxines en milieu professionnel. Certains sont cependant d'avis qu'une telle proposition est prématurée, essentiellement parce que les méthodes d'analyse sont insuffisamment harmonisées. À titre d'information, le comité néerlandais d'experts en VLEP a proposé 50 unités d'endotoxine par mètre cube (4,5 ng/m³ ; Heederik et Douwes, 1997), mais une telle valeur pourrait dépendre du type d'environnement (Latza et coll., 2004 ; Liebers et coll., 2006).
- Les problèmes de métrique et de métrologie ne sont actuellement pas suffisamment résolus pour envisager un suivi en routine parfaitement adapté à la nature des difficultés repérées. Dans l'état actuel des connaissances, il ne semble pas souhaitable d'encourager à effectuer des mesurages uniquement gravimétriques pour le suivi des PUF.

Il est clair que cette difficulté doit être résolue en priorité, car elle conditionne l'étendue et la qualité des connaissances nécessaires à l'établissement de valeurs limites fondées sur un ensemble représentatif de données objectives et reconnues.

- Les connaissances actuelles sont suffisantes pour estimer qu'une surveillance et des mesures de prévention ou de précaution devraient être appliquées dès que possible. Des valeurs limites provisoires (VME et VLE) pourraient être rapidement envisagées, si possible définies avec une métrique moins inadaptée que la concentration pondérale.

Pour ce qui se rapporte à la concentration en nombre de particules, rappelons que le niveau moyen de la pollution urbaine en nombre de PUF est de l'ordre de $1 \cdot 10^4$

à $5 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-3}$ (pour environ $1 \text{ } \mu\text{g}/\text{m}^3$), un pic correspond à environ $3 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$, mais peut atteindre 10^6 cm^{-3} en présence de circulation automobile.

Des propositions non débattues risqueraient d'apparaître arbitraires, ainsi que de ne pas répondre à l'ensemble des questions ou attentes concrètes (voir *Summary of the concluding discussion and outlook*, pp. 201-203 du rapport du BIA, 2003). Par ailleurs, mesurer les particules en nombre ou en surface ne peut tenir compte de leurs toxicités intrinsèques ou de la variabilité de leurs propriétés de surface. De plus, toutes les PUF ne proviennent pas de l'activité productrice, mais aussi, par exemple, de la pollution environnementale (circulation automobile dans une rue voisine), ou encore interne à l'établissement (chauffage au gaz). Il n'est actuellement pas possible de tenir compte spécifiquement de ce qui provient des différentes sources.

La période de recherche et de mise au point qui devrait être entreprise entraînera des évolutions, actuellement peu prévisibles. Il ne paraît pourtant pas sensé d'attendre que toutes les questions soient réglées pour prendre des dispositions de prévention alors que le risque est avéré.

Bibliographie

- ACGIH (2001). Particulates (insoluble) not otherwise specified (PNOS): ACGIH Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices, 7th Ed.
- American Thoracic Society (1999). What Constitutes an Adverse Health Effect of Air Pollution? *Am J Respir Crit Care Med* **161**(2) February 2000, 665-673. (This official statement of the American thoracic Society was adopted by the ATS board of directors, July 1999).
- Arimoto T, Kadiiska MB, Sato K, Corbett J, Mason R (2005). Synergistic production of lung free radicals by diesel exhaust particles and endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* **171**(4) 379-387.
- Bateson TF, Schwartz J (2004). Who is sensitive to the effects of particulate air pollution on mortality? A case-crossover analysis of effect modifiers. *Epidemiology* **15**(2) 143-149. Comment in: *Epidemiology* 2004 Mar; **15**(2) 131-132.
- Becker S, Soukup JM, Sioutas C, Cassee FR (2003). Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Exp Lung Res* **29**(1) 29-44.
- Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, Dominici F (2004). Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000. *J Am Med Assoc* **292**(19) 2372-2378.
- Berges M (2005). Ultrafine particles at workplaces – Activities of the BGIA. Research on occupational health and safety in nanotechnology, Copenhagen, 18 March 2005.
- BIA-Report 7/2003e. BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces", Carsten Möhlmann editor. 208 pages.
- Brouwer DH, Gijssbers JH, Lurvink MW (2004). Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies. *Ann Occup Hyg* **48**(5) 439-453.
- Calderon-Garcidueñas L, Maronpot RR, Torres-Jardon R, Henriquez-Roldan C, Schoonhoven R, Acuna-Ayala H, Villarreal-Calderon A, Nakamura J, Fernando R, Reed W, Azzarelli B, Swenberg JA (2003a). DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants

- is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicol Pathol* **31**(5) 524-538.
- Calderon-Garcidueñas L, Mora-Tiscareno A, Fordham LA, Valencia-Salazar G, Chung CJ, Rodriguez-Alcaraz A, Paredes R, Variakojis D, Villarreal-Calderon A, Flores-Camacho L, Antunez-Solis A, Henriquez-Roldan C, Hazucha MJ (2003b). Respiratory damage in children exposed to urban pollution. *Pediatr Pulmonol* **36**(2) 148-161.
- CE (1999). Directive 1999/30/CE du Conseil, du 22 avril 1999, relative à la fixation de valeurs limites pour l'anhydride sulfureux, le dioxyde d'azote et les oxydes d'azote, les particules et le plomb dans l'air ambiant. *Journal officiel* n° L 163 du 29/06/1999 pp. 0041-0060.
- Chalupa DC, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, Frampton MW (2004). Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ Health Perspect* **112**(8) 879-882.
- Chen Y, Yang Q, Krewski D, Burnett RT, Shi Y, McGrail KM (2005). The effect of coarse ambient particulate matter on first, second, and overall hospital admissions for respiratory disease among the elderly. *Inhal Toxicol* **17**(12) 649-655.
- Churg A, Brauer M, Avila-Casado M, Fortoul TI, Wright JL (2003). Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ Health Perspect* **111**(5) 714-718.
- COMEAP (1995). Committee on the Medical Effects of Air Pollutants. Non-biological particles and health. HMSO, London, 1995. <http://www.advisorybodies.doh.gov.uk/comeap/statementsreports/airpoll.htm>
- COMEAP (1998). COMEAP (Committee on the Medical Effects of Air Pollutants) statement on banding of air quality. <http://www.advisorybodies.doh.gov.uk/comeap/>
- Cyrys J, Stolzel M, Heinrich J, Kreyling WG, Menzel N, Wittmaack K, Tuch T, Wichmann HE (2003). Elemental composition and sources of fine and ultrafine ambient particles in Erfurt, Germany. *Sci Total Environ* **305**(1-3) 143-156.
- Dai J, Xie C, Vincent R, Churg A (2003). Air Pollution Particles Produce Airway Wall Remodeling in Rat Tracheal Explants. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29** (3 Pt 1) 352-358.
- Devlin RB, Ghio AJ, Kehrl H, Sanders G, Cascio W (2003). Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. *Eur Respir J Suppl.* **40**, 76s-80s.
- Donham KJ, Cumro D, Reynolds SJ, Merchant JA (2000). Dose-response relationships between occupational aerosol exposures and cross-shift declines of lung function in poultry workers: recommendations for exposure limits. *J Occup Environ Med* **42**(3) 260-269.
- Englert N (2004). Fine particles and human health--a review of epidemiological studies. *Toxicol Lett* **149**(1-3) 235-242.
- EPA (2003). Fourth external review draft of air quality criteria for particulate matter (June, 2003): Volume I (chapitres 1 à 5), volume II (chapitres 6 à 9). EPA/600/P-99/002aD.
- Expert Panel on Air Quality Standards (2001). Airborne Particles: What is the appropriate measurement on which to base a standard? A Discussion Document.
- Ferin J, Oberdörster G, Penney DP (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**(5) 535-542.
- Filleul L, Medina S, Cassadou S (2003). La pollution atmosphérique particulaire urbaine : de l'épidémiologie à l'impact sanitaire en santé publique. *Rev Epidémiol Santé Publ* **51**, 527-542.

- Ghio AJ, Hall A, Bassett MA, Devlin RB (2003). Exposure to concentrated ambient air particles alters hematologic indices in humans. *Inhal Toxicol* **15(14)** 1465-1478.
- Gong H Jr, Linn WS, Sioutas C, Terrell SL, Clark KW, Anderson KR, Terrell LL (2003). Controlled exposures of healthy and asthmatic volunteers to concentrated ambient fine particles in Los Angeles. *Inhal Toxicol* **15(4)** 305-325.
- Gong H Jr, McManus MS, Linn WS (1997). Attenuated response to repeated daily ozone exposures in asthmatic subjects. *Arch Environ Health* **52(1)** 34-41.
- Green LC, Crouch EA, Ames MR, Lash TL (2002). What's wrong with the National Ambient Air Quality Standard (NAAQS) for fine particulate matter (PM(2.5))? *Regul Toxicol Pharmacol* **35(3)** 327-337.
- de Hartog JJ, Hoek G, Peters A, Timonen KL, Ibaldo-Mulli A, Brunekreef B, Heinrich J, Tiittanen P, van Wijnen JH, Kreyling W, Kulmala M, Pekkanen J (2003). Effects of fine and ultrafine particles on cardiorespiratory symptoms in elderly subjects with coronary heart disease: the ULTRA study. *Am J Epidemiol* **157(7)** 613-623.
- Hahn FF, Barr EB, Ménache MG, Seagrave JC (2005). *Particle Size and Composition Related to Adverse Health Effects in Aged, Sensitive Rats*. HEI Research Report 129 (septembre 2005, 84 pages).
- Heederik D, Douwes J (1997). Towards an occupational exposure limit for endotoxins? *Ann Agric Environ Med* **4**, 17-19.
- Jorres RA, Holz O, Zachgo W, Timm P, Koschyk S, Muller B, Grimminger F, Seeger W, Kelly FJ, Dunster C, Frischer T, Lubec G, Waschewski M, Niendorf A, Magnussen H (2000). The effect of repeated ozone exposures on inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid and mucosal biopsies. *Am J Respir Crit Care Med* **161(6)** 1855-1861.
- Kaiser J (2005). Mounting evidence indicts fine-particle pollution. *Science* **307**, 1858-1861.
- Kappos AD, Bruckmann P, Eikmann T, Englert N, Heinrich U, Hoppe P, Koch E, Krause GH, Kreyling WG, Rauchfuss K, Rombout P, Schulz-Klemp V, Thiel WR, Wichmann HE (2004). Health effects of particles in ambient air. *Int J Hyg Environ Health* **207(4)** 399-407.
- Kittelson DB (1998). Engines and nanoparticles. A review. *J Aerosol Sci* **29(5-6)** 575-588.
- Krewski D, Burnett RT, Goldberg M, Hoover K, Siemiatycki J, Abrahamowicz M, White W (2005). Reanalysis of the Harvard Six Cities Study, Part I: Validation and Replication. *Inhal Toxicol* **17(7-8)** 335-342.
- Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A (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)** 1513-1530.
- Kreyling WG, Semmler M, Möller W (2004). Dosimetry and toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* **17(2)** 140-152.
- Kuschner WG, Wong H, D'Alessandro A, Quinlan P, Blanc PD (1997). Human pulmonary responses to experimental inhalation of high concentration fine and ultrafine magnesium oxide particles. *Environ Health Perspect* **105(11)** 1234-1237.
- Lam HF, Chen LC, Ainsworth D, Peoples S, Amdur MO (1988). Pulmonary Function of Guinea Pigs Exposed to Freshly Generated Ultrafine Zinc Oxide with and without Spike Concentrations. *Am Ind Hyg Assoc J* **4(7)** 333-341.
- Latza U, Oldenburg M, Baur X (2004). Endotoxin exposure and respiratory symptoms in the cotton textile industry. *Arch Environ Health*. **59(10)** 519-525.

- Lee CR, North KE, Bray MS, Fornage M, Seubert JM, Newman JW, Hammock BD, Couper DJ, Heiss G, Zeldin DC (2006). Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) and risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Hum Mol Genet.* **15(10)** 1640-1649.
- Levy JI, Chemerynski SM, Sarnat JA (2005). Ozone exposure and mortality: an empiric Bayes metaregression analysis. *Epidemiology* **16(4)** 458-468.
- Liebers V, Bruning T, Raulf-Heimsoth M (2006). Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans. *Am J Ind Med.* **49(6)** 474-491.
- Mar TF, Larson TV, Stier RA, Claiborn C, Koenig JQ (2004). An analysis of the association between respiratory symptoms in subjects with asthma and daily air pollution in Spokane, Washington. *Inhal Toxicol* **16(13)** 809-815.
- McClellan RO, Miller FJ (1997). An overview of EPA's proposed revision of the particulate matter standard. *CIIT Activities* **17(4)** 1-21.
- McDonald JD, Eide I, Seagrave JC, Zielinska B, Whitney K, Lawson DR, Mauderly JL (2004). Relationship between composition and toxicity of motor vehicle emission samples. *Environ Health Perspect* **112(15)** 1527-1538.
- Mermelstein R, Kilpper R (1990). Xerox exposure limit for respirable dust (N.O.S.). Presentation (paper 406) at American Industrial Hygiene Association Conference, Orlando, FL, U.S.A, may 21-25.
- Mermelstein R, Kilpper RW, Morrow PE, Muhle H (1994). Lung overload, dosimetry of lung fibrosis and their implications to the respiratory dust standard. *Ann Occup Hyg* **38** (Suppl. 1) 313-322.
- Monn C, Naef R, Koller T (2003). Reactions of macrophages exposed to particles <10 microm. *Environ Res* **91(1)** 35-44.
- Moolgavkar SH (2005). A review and critique of the EPA's rationale for a fine particle standard. *Regulat Toxicol Pharmacol* **42(1)** 123-144.
- Morawska L, Moore MR, Ristovski ZD (2004). Health Impacts of Ultrafine Particles. Desktop literature review and analysis. Australian Government, Department of the Environment and Heritage, 222 pages, plus annexes.
- Muhle H (1993). Dusts and OELs. Background document prepared for the Scientific expert group on occupational exposure limits. SEG/KEY/11, August 1993, 46 pages (for official use only).
- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE (1994). Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* **102** (Suppl. 5), 173-179.
- OMS (2004). Health aspects of air pollution – Answers to follow-up questions from CAFE. Report on a WHO working group meeting Bonn, Germany, 15-16 January 2004.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ (2004). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* **109(1)** 71-77.
- Ramachandran G, Paulsen D, Watts W, Kittelson D (2005). Mass, surface area and number metrics in diesel occupational exposure assessment. *J Environ Monit* **7(7)** 728-735.
- Riechelmann H, Rettinger G, Weschta M, Keck T, Deutschle T (2003). Effects of low-toxicity particulate matter on human nasal function. *J Occup Environ Med* **45(1)** 54-60.

- Rom WN, Samet JM (2006). Small particles with big effects. *Am J Respir Crit Care Med* **173** 365-366 (editorial).
- Royal Society (2004). The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. Nanosciences and nanotechnology. July 2004.
- Samoli E, Analitis A, Touloumi G, Schwartz J, Anderson HR, Sunyer J, Bisanti L, Zmirou D, Vonk JM, Pekkanen J, Goodman P, Paldy A, Schindler C, Katsouyanni K (2005). Estimating the exposure-response relationships between particulate matter and mortality within the APHEA multicity project. *Environ Health Perspect* **113**(1) 88-95. Erratum in: *Environ Health Perspect* **113**(5) A297.
- Sarnat JA, Schwartz J, Catalano PJ, Suh HH (2001). Gaseous pollutants in particulate matter epidemiology: confounders or surrogates? *Environ Health Perspect* **109**(10) 1053-1061.
- SCENIHR (2005). Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Opinion on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. SCENIHR/002/05, adopted 29 September 2005 (78 pages).
- Schins RP, Lightbody JH, Borm PJ, Shi T, Donaldson K, Stone V (2004). Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**(1) 1-11.
- Schwartz J (2005). How sensitive is the association between ozone and daily deaths to control for temperature? *Am J Respir Crit Care Med* **171**(6) 627-631.
- Schwartz J (2004a). Is the association of airborne particles with daily deaths confounded by gaseous air pollutants? An approach to control by matching. *Environ Health Perspect* **112**(5) 557-561.
- Schwartz J (2004b). The effects of particulate air pollution on daily deaths: a multi-city case crossover analysis. *Occup Environ Med* **61**(12) 956-961.
- Schwartz J (2000a). Daily deaths are associated with combustion particles rather than SO₂ in Philadelphia. *Occup Environ Med* **57**(10) 692-697.
- Schwartz J (2000b). The distributed lag between air pollution and daily deaths. *Epidemiology* **11**(3) 320-326.
- Schwartz J, Neas LM (2000). Fine particles are more strongly associated than coarse particles with acute respiratory health effects in schoolchildren. *Epidemiology* **11**(1) 6-10. Comment in: *Epidemiology* **11**(1) 2-4.
- Serita F, Kyono H, Seki Y (1999). Pulmonary clearance and lesions in rats after a single inhalation of ultrafine metallic nickel at dose levels comparable to the threshold limit value. *Ind Health* **37**(4) 353-363.
- Sunyer J, Atkinson R, Ballester F, Le Tertre A, Ayres JG, Forastiere F, Forsberg B, Vonk JM, Bisanti L, Anderson RH, Schwartz J, Katsouyanni K (2003a). Respiratory effects of sulphur dioxide: a hierarchical multicity analysis in the APHEA 2 study. *Occup Environ Med* **60**(8) e2.
- Sunyer J, Ballester F, Tertre AL, Atkinson R, Ayres JG, Forastiere F, Forsberg B, Vonk JM, Bisanti L, Tenias JM, Medina S, Schwartz J, Katsouyanni K (2003b). The association of daily sulfur dioxide air pollution levels with hospital admissions for cardiovascular diseases in Europe (The Aphea-II study). *Eur Heart J* **24**(8) 752-760.
- Sunyer J, Basagana X (2001). Particles, and not gases, are associated with the risk of death in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Epidemiol* **30**(5) 1138-1140.

- Timblin CR, Shukla A, Berlanger I, BeruBe KA, Churg A, Mossman BT (2002). Ultrafine airborne particles cause increases in protooncogene expression and proliferation in alveolar epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **179(2)** 98-104.
- Toya T, Serita F, Sawatari K, Fukuda K (1997). Lung Lesions Induced by Intratracheal Instillation of Nickel Fumes and Nickeloxide Powder in Rats. *Industrial Health* **35(1)** 69-77.
- Wichmann HE, Spix C, Tuch T, Wolke G, Peters A, Heinrich J, Kreyling WG, Heyder J (2000). Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany. Part I: role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst* (98):5-86; discussion 87-94.
- Zanobetti A, Schwartz J (2002). Cardiovascular damage by airborne particles: are diabetics more susceptible? *Epidemiology*. **13(5)** 588-592.
- Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, Nakakuki K, Kohyama N, Donaldson K (1998). Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *J Toxicol Environ Health A* **53(6)** 423-438.

Conclusions générales

Cette partie commence par un résumé des principaux aspects de cet ouvrage concernant les dangers et risques des PUF. Les conclusions et recommandations du groupe de travail sont ensuite présentées. L'ouvrage se termine par un tour d'horizon des domaines de recherche dans lesquels il serait nécessaire de progresser pour mieux répondre aux nombreuses questions que soulèvent ces nouvelles technologies.

1. Dangers et risques présentés par les particules ultra-fines : synthèse et questionnements

1.1. Définition des PUF et contexte de cet ouvrage

Dans l'état actuel des connaissances, on peut définir un aérosol ultra-fin comme composé de particules ultra-fines individuelles, ou groupées en agglomérats ou agrégats. La taille de ces dernières structures peut dépasser le micromètre. On peut donc considérer qu'un aérosol ultra-fin couvre le domaine submicronique dans son ensemble.

L'épidémiologie a établi que la pollution atmosphérique peut aggraver ou provoquer des maladies, voire tuer. Les données sont nombreuses, d'origines multiples et apparemment

convergentes, mais leur interprétation en termes d'agents causaux et de mécanismes toxicologiques laisse place à de nombreux débats. L'un des constituants de la pollution répétitivement mis en cause est l'aérosol, particulièrement urbain ou d'origine industrielle, dans lequel on distingue conventionnellement des particules grossières, fines ou ultra-fines.

Par ailleurs de nombreux travaux expérimentaux, *in vitro* comme *in vivo*, ont montré que les particules ultra-fines ont des propriétés physicochimiques et toxicologiques particulières, liées notamment à leur taille et à leur surface.

Il est donc nécessaire de faire un point sur les risques encourus lors de l'exposition à des PUF et sur les mesures de prévention ou de précaution à prendre pour s'en prémunir. Le présent ouvrage s'est consacré plus particulièrement au contexte de l'exposition professionnelle à des PUF d'espèces chimiques, essentiellement minérales, réputées peu solubles.

1.2. Pénétration des PUF dans l'organisme

1.2.1. Pénétration dans les poumons et clairance

Pénétration et dépôts pulmonaires

Il faut rappeler quelques caractéristiques essentielles particulières aux PUF :

- elles sont susceptibles de se déposer dans l'ensemble des voies respiratoires avec une efficacité supérieure à celle de particules plus grosses, ceci étant notamment dû au mouvement brownien. Il en résulte qu'elles sont déposées dans les voies respiratoires de façon plus homogène et en bien plus grand nombre que les particules de plus grande taille ;
- ces dépôts sont d'autant plus marqués que la respiration est accusée (donc en toutes conditions impliquant un effort physique) ou la fonction pulmonaire altérée (BPCO par exemple) ;
- lorsqu'elles ne sont pas fortement diluées, donc généralement au voisinage de leurs sources d'émission, les PUF forment des agrégats de forte cohésion, ou des agglomérats, moins cohésifs. Les propriétés physiques de ces entités sont celles de particules plus grosses ; la pénétration et le dépôt dans les voies pulmonaires sont modifiés en conséquence.

Clairance pulmonaire

Le mécanisme de la clairance pulmonaire dépend de l'endroit où les particules se sont déposées, tractus respiratoire supérieur, arbre trachéobronchique, ou région alvéolaire. Les

macrophages alvéolaires assurent la majeure part de la clairance des particules déposées au niveau des alvéoles pulmonaires ; ce processus est rapide mais saturable. Le recrutement des macrophages alvéolaires augmente avec le nombre de particules déposées ; à masse égale, il est donc plus important pour les PUF. Toutefois certaines de ces dernières (< 20 nm) sont moins efficacement phagocytées et ont donc une probabilité plus grande d'être endocytées par les cellules épithéliales puis transférées vers l'interstitium.

Les caractéristiques et évolutions de l'agrégation des PUF, et leurs conséquences toxicologiques éventuelles, sont mal connues, surtout en milieux biologiques.

1.2.2. Passage de PUF jusqu'au cerveau

Le passage d'espèces chimiques de la voie nasale vers le cerveau peut court-circuiter la barrière hémato-encéphalique en passant par le nerf olfactif, lequel est, par la muqueuse olfactive, au contact des polluants externes. Le nerf trijumeau, innervant en partie la cavité nasale, pourrait également servir de voie de pénétration.

Le cas du manganèse, le plus étudié, montre que les mécanismes de passage d'éléments métalliques sont complexes ; l'espèce chimique et sa solubilité jouent un rôle. Tout se passe comme s'il y avait possibilité de coexistence de mécanismes de pénétration par diffusion ou par transport de particules.

Le cas de substances inorganiques choisies spécifiquement pour leur « insolubilité » semble avoir été peu étudié. La pénétration de nanoparticules d'or radioactif (taille 50 nm) a été mise en évidence par microscopie électronique, par plusieurs équipes et sur plusieurs espèces animales, après instillation intranasale ; une vitesse de progression dans le neurone olfactif d'environ 2,5 mm/heure a été mesurée. Des résultats plus ou moins similaires ont été obtenus par différentes équipes, avec des particules de carbone radioactif (36 nm ; rat ; transfert relativement important ; Oberdörster et coll., 2004), d'iridium (15 nm ou 80 nm ; transfert très faible ; Semmler et coll., 2004), ou encore avec du fullérène C₆₀ en suspension aqueuse (achigan à grande bouche juvénile ; Oberdörster, 2004).

Le passage de certaines PUF depuis les fosses nasales jusqu'au cerveau doit être considéré comme probable. Les modalités et l'importance de ce passage dépendent de la nature de la particule, de ses revêtements de surface, de sa taille, de sa solubilité, et peut-être aussi de facteurs extrinsèques.

1.2.3. Passage de PUF par la peau

Le passage percutané de PUF peut sembler improbable au vu des propriétés de la peau ; une telle éventualité a été plus particulièrement étudiée pour TiO₂ et ZnO du fait de leur utilisation dans des formulations cosmétiques.

Le TiO_2 des crèmes solaires est constitué de particules de 14 à 30 nm, de surfaces spécifiques de 100 à 50 m^2/g , avec des revêtements de surface inorganiques et organiques. Plusieurs travaux ont étudié la pénétration sur peau de porc excisée. Avec différents échantillons, TiO_2 a été observé sur la couche la plus externe du *stratum corneum* et, très occasionnellement, dans la partie supérieure du follicule pileux ; aucune particule n'a été trouvée en profondeur. D'autres auteurs, au contraire, estiment avoir prouvé une pénétration à travers le *stratum corneum* et même dans le *stratum granulosum*.

Le ZnO micronisé (particules de 40 à 100 nm) est généralement utilisé en complément du TiO_2 . Les données disponibles pour cette espèce chimique sont relativement anciennes et ne permettent pas de conclure à sa pénétration sous forme particulaire.

Diverses particules organiques solides insolubles (quoique généralement biodégradables) ont été étudiées.

Globalement, il semble qu'une certaine pénétration cutanée soit possible. La taille de la particule joue un rôle, les plus grosses (plusieurs μm) demeurant à la surface de la peau, de plus petites (1 à 5 μm) tendant à s'accumuler dans les follicules pileux. En ce qui concerne des PUF proprement dites, il a été montré que des flexions cutanées répétées, normales dans une activité de travail, favorisent une pénétration en profondeur et, dans le cas de particules présentant une certaine souplesse, jusqu'à la peau viable. La démonstration semble complétée par une étude de la pénétration cutanée de nanocristaux fluorescents (*quantum dots*, tailles de 4 à 12 nm) de différentes formes et revêtements de surface (Ryman-Rasmussen et coll., 2006).

Par ailleurs, il faut rappeler que les travaux sont effectués sur des peaux saines en bon état. En conditions réelles, les mains ne sont pas « idéales » ; de simples microfissures, invisibles à l'œil nu, peuvent constituer une porte de pénétration pour n'importe quel type de PUF.

1.3. Synthèse et discussion sur les déterminants de la toxicité des PUF

1.3.1. Que peut-on tirer des données environnementales ?

Les études épidémiologiques en milieux environnementaux ou professionnels ont des caractéristiques très différentes (tableau 9.I), au point qu'on peut s'interroger sur les apports possibles des premières aux secondes et à la prévention des risques professionnels.

Des conclusions concrètes peuvent cependant être proposées :

- une surveillance médicale des personnes professionnellement exposées à des PUF devrait inclure – au-delà du système pulmonaire – celle du système

Études épidémiologiques en environnement	Études épidémiologiques en milieux professionnels
1) Les populations des études de cohorte et des séries temporelles sont de très grande taille, comportant des sujets à risque et permettant de mettre en évidence des risques faibles. Les études de panel sont réalisées dans des sous-populations particulières (asthmatiques, enfants...). Les mesures effectuées sur les personnes sont répétées, ce qui permet d'en obtenir un grand nombre.	Les populations concernées sont beaucoup plus réduites et en bonne santé relative (<i>Healthy Worker Effect</i>) ; on ne trouve pas ou peu de personnes « malades » en tant que telles.
2) Les données métrologiques sont généralement abondantes.	Les données métrologiques sont souvent rares et/ou anciennes, parfois « reconstituées » après enquête.
3) Les modèles de dépouillement des résultats sont particuliers à ce domaine.	Certaines techniques nouvelles ou améliorées ne pourraient-elles être transposées ?
4) Des effets sont constatés dans la population générale (morbidité et mortalité), notamment aux niveaux pulmonaires et/ou cardiovasculaires.	Il n'est pas sûr que ces effets soient constatables en milieux professionnels (ci-dessus), mais ils constituent des points d'appel pour la prévention. La question d'un risque de cancer pulmonaire reste posée dans certains cas (PED, noir de carbone).
5) Les agents étiologiques et les mécanismes ne sont pas déterminés, mais il semble que les particules des différentes classes comme certains polluants gazeux (SO ₂ , O ₃ , NO _x) jouent un rôle.	L'exposition professionnelle, surajoutée, n'est ni de même nature ni de même intensité. Aux teneurs environnementales usuelles, les effets des polluants gazeux semblent limités ou absents en milieux professionnels.

Tableau 9.I. Quelques points de comparaison entre études épidémiologiques en environnement (colonne de gauche) et en milieux professionnels (colonne de droite).

cardiovasculaire et se préoccuper du devenir des PUF ayant pénétré dans l'organisme (organes cibles ou d'accumulation potentielle) ;

- les personnes présentant des maladies cardiovasculaires ou respiratoires et les atopiques devraient faire l'objet d'une attention particulière ;
- une attention plus grande ou renouvelée sera portée, en milieux professionnels, aux personnes exposées à l'ozone et/ou au dioxyde de soufre, ainsi qu'aux oxydes d'azote ;

- ne pas oublier qu’il existe un « effet particules ultra-fines », dont les effets peuvent être plus accusés, voire différents, de ceux de particules plus grossières de la même substance, mais aussi que la nature de la particule conserve une grande importance dans l’expression de la toxicité.

Ces conclusions doivent être impérativement intégrées aux dispositions d’ensemble de la prévention des effets des PUF en milieux professionnels.

1.3.2. Importance de la taille de la particule

L’efficacité de phagocytose et donc d’épuration pulmonaire dépend de la taille des particules : elle est impossible pour les particules trop grandes – par exemple pour des fibres de longueur supérieure à environ 20 μm – et moins efficace pour des particules très petites – dimension inférieure à environ 20 nm. Ainsi les particules primaires voient leur probabilité d’internalisation par les cellules du parenchyme pulmonaire augmenter.

La taille des particules joue aussi un rôle dans leurs interactions avec les protéines du milieu biologique ; plus les particules sont grosses, plus les protéines sont susceptibles d’avoir des points de fixation à leur surface, ce qui engendre des modifications de leur conformation, et parfois leur dénaturation. La tendance des particules à donner naissance à des agrégats et agglomérats, de structures relativement plus poreuses, peut donc intervenir sur leurs effets à l’échelle moléculaire.

Enfin, la toxicité des particules environnementales d’origine anthropique semble en partie inversement corrélée à leur taille, les plus petites semblant les plus nocives (voir Gilmour et coll., 2004). Cette caractéristique transparaît plus ou moins dans certaines études épidémiologiques (par exemple Dominici et coll., 2006 ; Laden et coll., 2006 ; Lanki et coll., 2006 ; Ostro et coll., 2006, parmi les plus récentes) ; elle est plus nette dans les études expérimentales, notamment *in vitro* (Shima et coll., 2006 ; Gilmour et coll., 2004 ; Donaldson et coll., 2002). Ces particules sont plus riches en éléments métalliques et en espèces chimiques organiques, susceptibles soit d’exercer une toxicité propre (voir chapitre 8 ; Penttinen et coll., 2006 ; Kendall et coll., 2001 ; Hiura et coll., 2000) soit d’interagir avec d’autres constituants (Wilson et coll., 2002).

1.3.3. Rôle de la surface

| Caractéristiques générales

La composition et la réactivité de la surface d’un solide sont souvent particulières, et modulées par divers facteurs dont la granulométrie, la cristallinité et les plans cristallographiques exposés, la composition et la présence de contaminants à la surface.

L'activité de la surface est liée à la présence de sites actifs (tels que ions métalliques, radicaux de surface, ou molécules organiques adsorbées), à son hydrophilie, à la présence de sites capables de former des liaisons hydrogène ou encore de réagir avec des molécules antioxydantes, à l'existence de charges superficielles (adsorption de protéines, interactions avec les membranes cellulaires...). Toute surface solide adsorbe, en fonction de sa composition et de sa topographie, des molécules environnantes ; ces dernières peuvent être ensuite déplacées par des protéines.

La recherche de revêtements minimisant les interactions avec les protéines conduit à prolonger la durée de vie de la particule dans l'organisme (Owens et Peppas, 2006), ce qui peut favoriser son transport jusqu'à un organe où elle sera stockée.

Il semble donc important de s'enquérir des traitements de surface appliqués et des modifications induites des caractéristiques des particules.

| Hydrophilie/hydrophobie

L'hydrophilie d'un solide est un facteur clé de ses interactions avec les macromolécules biologiques. D'une façon générale, il a été mis en évidence, avec différents types de particules et de revêtements, que les particules les plus hydrophiles sont moins phagocytées par les macrophages et ont une durée de vie relativement prolongée dans la circulation générale ; inversement, les plus hydrophobes sont plus rapidement recouvertes de protéines (opsonisation) puis phagocytées.

In vivo, le statut hydrophile ou hydrophobe de la surface semble avoir peu d'incidence à court terme sur les paramètres cellulaires et biochimiques du LLBA ; les raisons n'en sont pas claires.

| Forces électrostatiques

La plupart des groupes fonctionnels qui donnent un caractère hydrophile peuvent se dissocier et donner naissance à des interactions électrostatiques ou former des liaisons hydrogène (typiquement les groupements OH ou NH).

Une théorie suggère que l'interaction entre surface et macromolécules dépendrait surtout des charges superficielles. Ainsi, l'adsorption de cations sur les groupements SiO^- de la silice conduit à une sensible diminution de son activité hémolytique.

Les interactions électrostatiques sont fonction du pH (qui joue sur le degré d'ionisation des protéines) et de la force ionique. Par exemple, à pH élevé, l'adsorption est réduite en raison des forces de répulsion entre les charges négatives de la surface et celles de la protéine (groupes COO^-). Le maximum d'adsorption se produit à pH 6-7, où dominent

les forces d'attraction entre les charges négatives des solides et celles positives de la protéine (groupes -NH_3^+), dont le point isoélectrique est proche de 7.

Une charge positive des particules semble susceptible de modifier la fonction vasculaire, comme il a été montré, après instillation intratrachéale chez le hamster, avec des PUF de polystyrène de différentes dimensions (Nemmar et coll., 2004).

| Discussion

Nombre de travaux indiquent une relation entre l'aire des particules (surface calculée) à laquelle les animaux ou cellules ont été exposés et certains effets biologiques, comme effets inflammatoires pulmonaires *in vivo* (nombre de PMN) ou *in vitro*, accroissement de la perméabilité vasculaire, développement de tumeurs expérimentales. L'interprétation est limitée par le petit nombre de points et de types de particules étudiés ; de plus, toutes les données ne sont pas concordantes.

Quelques auteurs ont réanalysé les données sur le potentiel tumorigène chez l'animal. S'il n'y a pas de bonne corrélation entre la masse de diverses particules retenues dans le poumon et la réponse tumorale, la relation est nettement améliorée lorsque la charge pulmonaire est exprimée en surface. Cependant, des incidences tumorales voisines ont été notées pour des surfaces de particules retenues différentes (TiO_2 et CB), ce qui a suscité l'hypothèse d'une désagrégation plus rapide des PUF de TiO_2 (Oberdörster, 1996). Pour ces mêmes substances, Heinrich et coll. (1995) avaient conclu que c'est la dose cumulée en masse qui est corrélée avec la formation de tumeurs.

Il semble actuellement prématuré, et dans certains cas injustifié, de considérer l'aire des particules retenues par le poumon comme un paramètre suffisant voire unique pour caractériser l'activité biologique des particules. Des constituants présents à la surface peuvent moduler, voire gouverner, cette activité.

1.3.4. Rôle de constituants présents à la surface des particules

| Ions de métaux de transition

Bien que de composition variable selon leur origine et l'emplacement de la surface étudié, les particules fines et ultra-fines sont souvent riches en éléments métalliques. Or les ions des métaux de transition peuvent jouer un rôle primordial dans la production d'espèces radicalaires ; leur réactivité dépend de la typologie, de l'état d'oxydation et de l'état de coordination. Usuellement, les plus réactifs, *in vitro*, sont Fe et Cu.

Les éléments métalliques adsorbés sur les PUF peuvent exercer une toxicité locale ou systémique. Le rôle des espèces métalliques dans la toxicité des particules environnementales est étayé par une série d'arguments expérimentaux indiquant que la fraction soluble, principalement le Fe, est responsable, au moins en partie, de leur toxicité. Il a également été montré que la fraction insoluble pouvait catalyser la formation d'EAO.

Il est vraisemblable que la fraction soluble obtenue en laboratoire ne reflète pas fidèlement la fraction mobilisée *in vivo*. Un examen individualisé de chaque type de particule reste indispensable pour bien appréhender les déterminants de la toxicité.

| Radicaux de surface

Des espèces radicalaires peuvent être produites en solution par l'action de radicaux présents à la surface d'une particule. Ceci a été bien mis en évidence sur des surfaces siliciques où le broyage peut provoquer la rupture homolytique de liaisons silicium-oxygène avec formation d'espèces telles que $\text{Si}^\bullet$, $\text{SiO}^\bullet$, qui peuvent à leur tour réagir. Il semble que la cytotoxicité pourrait être plutôt liée à la capacité de génération d'espèces réactives qu'à la surface disponible en elle-même (Sayes et coll., 2006 ; Warheit et coll., 2006).

| Composés organiques

La présence de métaux à la surface ne suffit pas toujours à expliquer la capacité des PUF à produire des espèces radicalaires (exemple du noir de carbone). Par ailleurs, plus les particules atmosphériques sont fines, plus elles sont riches en composés organiques par unité de masse.

Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Parmi les composés organiques adsorbés à la surface de particules, les HAP ont été souvent mis en cause. Pour discerner leur rôle propre, des études comparatives ont été menées entre noir de carbone (CB) à faible teneur en HAP et particules d'échappement diesel (PED). On a observé que si du benzo[a]pyrène marqué adsorbé était partiellement et rapidement biodisponible, une majeure partie restait fortement fixée sur la particule. La fraction biodisponible peut être à l'origine de la formation d'adduits à l'ADN, mais leur taux reste très faible.

Par ailleurs, *in vivo*, les effets cancérogènes pulmonaires de ces deux types de particules carbonées sont pratiquement indiscernables, ce qui tend à montrer que le rôle des HAP n'est pas prédominant. Ils n'ont d'ailleurs été mis en évidence, chez le rat, que pour des concentrations supérieures à environ 1 mg/m^3 ; reste à déterminer si cette réponse est

spécifique de cette espèce, ou si elle est transposable à l'homme. Les questions scientifiques encore en suspens sur ce point incitent à la prudence.

Quinones

L'oxygène à la surface des PED s'y trouve sous forme de groupements carboxylique, phénol, quinone ou encore lactone. Les quinones peuvent former des radicaux super-oxyde en présence de NADPH cytochrome P450 réductase et de NADPH ; l'élimination par un solvant ou la réduction par voie chimique de ces quinones montre qu'elles ont un rôle effectif.

Endotoxines

Des expérimentations avec des particules environnementales ont conduit à reconnaître l'implication d'endotoxines dans la genèse d'une inflammation pulmonaire chez le rat après instillation. Il est donc nécessaire d'en tester la présence et d'en évaluer les effets pour ne pas fausser l'interprétation des résultats, précaution trop souvent inappliquée.

1.3.5. Questionnements

La masse des particules, leur taille, leur nombre, leurs propriétés de surface, leur composition chimique, leur cristallinité... peuvent jouer un rôle, mais on ne sait pas toujours bien dans quelle mesure ni de quelle manière. Tous ces paramètres ne sont pas quantifiables, mais on sait par exemple que la concentration massique n'est pas le paramètre à privilégier pour les PUF, ou que certaines techniques sont insuffisamment mûres (notamment la mesure de la surface en temps réel). Les connaissances de la diversité et de la réalité des expositions professionnelles sont très insuffisantes.

Il semble nécessaire de faire porter à court terme et en priorité un gros effort sur les techniques métrologiques (Surkovic, 2005), leurs avantages et inconvénients respectifs, et leurs liens avec les observations toxicologiques et/ou épidémiologiques des effets des PUF en situation d'exposition professionnelle. De tels efforts dépendent en effet la mise au point et le contrôle de l'adéquation de mesures de prévention, comme une approche mieux informée du rôle et de l'importance de paramètres physicochimiques dans la toxicité des PUF.

Par ailleurs, d'autres paramètres que ceux évoqués ci-dessus peuvent intervenir dans la toxicité des PUF. Il a par exemple été montré, avec différents échantillons de MnO_2 , que l'amplitude de la réponse inflammatoire était fonction de la surface spécifique ; cependant, un échantillon fraîchement broyé montrait une activité comparable à celle d'un échantillon de surface spécifique très supérieure (Lison et coll., 1997). On sait également que différents paramètres toxicologiques peuvent intervenir de manières

différentes dans des conditions expérimentales identiques, et que divers types de cellules présentent des réactions différentes. Ceci ne plaide pas en faveur d'une généralisation trop rapide de résultats encore limités.

En effet, l'évaluation de dommages potentiels a surtout porté sur la réponse inflammatoire pulmonaire et, à un moindre degré, sur la fonction vasculaire. Ces études ont seulement concerné, le plus souvent, des effets à court terme. Les données corrélant effets biologiques et différents paramètres (masse, nombre, surface, éléments organiques, métalliques ou biologiques adsorbés) ne permettent pas de dégager un paramètre prédictif unique. L'état d'agrégation/désagrégation des particules dans les différents milieux biologiques joue, pour une masse donnée, sur les dimensions et le nombre de particules au contact des cellules, ce qui pourrait avoir une influence sur la toxicité (Oberdörster et coll., 1992 ; Oberdörster, 2004). Les effets des PUF dépendent aussi des éléments adsorbés, tels que métaux (production d'EAO, avec un potentiel différent selon l'élément), fraction organique, ou encore endotoxines dont il est indispensable de déterminer la présence avant d'attribuer une inflammation pulmonaire à une autre cause.

La production d'EAO, en particulier de radicaux libres, est liée à la nature de la surface plutôt qu'à sa dimension. Les cellules elles-mêmes sont capables de produire ces molécules. D'autres paramètres, tels que la quantité de particules phagocytées et leur toxicité sont des facteurs importants de la réponse cellulaire.

Vouloir faire dépendre une grande variété d'effets biologiques d'un unique paramètre serait donc réducteur. De même, vouloir généraliser les conclusions obtenues avec des PUF de l'air ambiant à des nanoparticules issues de nanotechnologies mérite réflexion, puisque leurs natures chimiques diffèrent. L'analyse des effets des PUF montre que la réponse biologique dépend de nombreux paramètres ; elle devra donc le plus possible faire appel à des analyses multifactorielles.

1.4. Quelles mesures de prévention, de précaution ?

Protection des voies respiratoires

L'efficacité de filtration des PUF dépend de divers mécanismes physiques, essentiellement inertie, interception et diffusion ; elle est minimale entre 0,1 et 0,5 μm , domaine de tailles pour lequel l'inertie comme la diffusion sont relativement faibles. Du fait de l'agitation brownienne, elle augmente en deçà, mais on dispose de peu de données d'efficacité pour les tailles inférieures à 5 nm. Du fait du rôle possible de fuites aux joints d'étanchéité avec le visage, et en l'absence de connaissances relatives à la toxicité des PUF, l'équipement de protection respiratoire recommandé est l'appareil filtrant à

ventilation assistée avec masque complet, disposant d'un filtre de type P3 selon la norme NF EN 12942.

Valeurs limites d'exposition professionnelle

Les dangers des PUF étant reconnus, il devient nécessaire de définir, dans toute la mesure du possible, des valeurs limites d'exposition professionnelle par voie inhalatoire, lesquelles contribueront à la réduction des risques de maladies d'origine professionnelle et à la gestion quotidienne de la salubrité des postes de travail. Cet objectif est d'autant plus important que les expositions en milieux professionnels peuvent être plus importantes en termes de concentrations, présenter une variabilité spatio-temporelle plus accusée, comprendre des composés de dangerosité élevée ou mal déterminée, ou encore accroître les risques de pénétration dans l'organisme par d'autres voies, notamment cutanée.

De très sérieuses difficultés mettent un tel objectif hors d'atteinte immédiate : non-disponibilité ou absence de moyens métrologiques adaptés, non-définition du paramètre à retenir pour caractériser l'exposition (concentration massique, surfacique, en nombre... ?), ignorance fréquente des propriétés toxicologiques des nanoparticules présentes (organe-cible, indicateur d'effet ou d'exposition...), importance d'expositions concomitantes (en particulier à des gaz comme l'ozone, les oxydes d'azote ou encore l'oxyde de carbone), degré de pertinence d'une « valeur limite générique PUF », prise en compte des « groupes à risque », etc.

Ces difficultés doivent non pas décourager, mais au contraire vivement stimuler, les efforts à entreprendre pour protéger les personnes exposées. En effet, tant qu'ils ne seront pas sérieusement entrepris et suffisamment avancés, les expositions professionnelles seront injustifiables, ou les protections à mettre en place possiblement démesurées par rapport au risque réel. Enfin, d'une part il existe des valeurs limites qui, même si elles peuvent être critiquées et améliorées, sont déjà applicables (telles que fumées de soudage, PUF de ZnO, noir de carbone...) ; d'autre part, un premier pas peut être fait pour les nanoparticules de substances faisant déjà l'objet d'une VLEP seulement pour des formes micrométriques. Ce premier pas pourrait consister à adopter pour les PUF une valeur limite qui serait égale ou inférieure à celle existante, divisée par le rapport des surfaces spécifiques entre les deux formes.

1.5. Quelles pistes de recherche ?

Dans les budgets dévolus aux nanotechnologies, la part des efforts consacrés à l'étude des effets potentiels des nanoparticules sur la santé, de l'ordre de 4 % aux États-Unis, est notoirement insuffisante. Ceci pourrait aboutir, comme ce fut le cas dans d'autres contextes, à constater tardivement des effets dont le coût de prise en charge pourrait

notablement dépasser les économies momentanées réalisées et entraîner un rejet sociétal aux conséquences étendues, y compris à d'autres domaines scientifiques et techniques.

Des efforts nettement plus significatifs doivent être entrepris aussi bien dans le domaine métrologique que dans celui des effets biologiques, ou dans les dispositifs de prévention et l'évaluation de leur efficacité réelle, sans parler des effets environnementaux ou du devenir des nanoparticules en fin de vie des produits manufacturés.

1.6. Observations finales

Une grande partie des informations disponibles se rapporte à des particules de taille supérieure à 100 nm, sans qu'on sache encore si, et dans quelle mesure, elles sont extrapolables au domaine des particules ultra-fines. Le recul scientifique est insuffisant pour s'exprimer de façon générale sur ce point.

Il sera nécessaire d'améliorer les interactions entre disciplines scientifiques, la qualité et la transparence des informations, la participation d'associations représentatives comme de syndicats de travailleurs, de s'assurer de l'indépendance de jugement et d'expression de groupes constitués et, enfin, de clarifier qui est responsable de quelles décisions, et les critères de base de ces décisions. Les questions en jeu ne sont donc pas seulement scientifiques et techniques, loin de là, mais aussi politiques au sens large du terme. C'est par conséquent ici que s'arrête cette expertise, en espérant, par les informations et les suggestions qu'elle apporte, qu'elle contribuera positivement aux débats et aux décisions à venir.

Bibliographie

- Dominici F, Peng RD, Bell ML, Pham L, McDermott A, Zeger SL, Samet JM (2006). Fine Particulate Air Pollution and Hospital Admission for Cardiovascular and Respiratory Diseases. *J Am Med Assoc* **295**, 1127-1134.
- Donaldson K, Tran CL, MacNee W (2002). Deposition and effects of fine and ultrafine particles in the respiratory tract. *Europ Respir Monogr* **7**, 77-92.
- Gilmour MI, O'Connor S, Dick CA, Miller CA, Linak WP (2004). Differential pulmonary inflammation and *in vitro* cytotoxicity of size-fractionated fly ash particles from pulverized coal combustion. *J Air Waste Manag Assoc* **54**(3) 286-295.
- Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K (1995). Chronic Inhalation Exposure of Wistar Rats and Two Different Strains of Mice to Diesel Engine Exhaust, Carbon Black, and Titanium Dioxide. *Inhal Toxicol* **7**(4) 533-556.
- Hiura TS, Li N, Kaplan R, Horwitz M, Seagrave JC, Nel AE (2000). The Role of a Mitochondrial Pathway in the Induction of Apoptosis by Chemicals Extracted from Diesel Exhaust Particles. *J Immunol* **165**, 2703-2711.

- Kendall M, Hamilton RS, Watt J, Williams ID (2001). Characterisation of selected speciated organic compounds associated with particulate matter in London. *Atmosph Environ* **35** (14) 2483-2495.
- Laden F, Schwartz J, Speizer FE, Dockery DW (2006). Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *Am J Respir Crit Care Med*. **173**(6) 667-672.
- Lanki T, de Hartog JJ, Heinrich J, Hoek G, Janssen NA, Peters A, Stolzel M, Timonen KL, Vallius M, Vanninen E, Pekkanen J (2006). Can we identify sources of fine particles responsible for exercise-induced ischemia on days with elevated air pollution? The ULTRA study. *Environ Health Perspect*. **114**(5) 655-660.
- Lison D, Lardot C, Huaux F, Zanetti G, Fubini B (1997). Influence of particle surface area on the toxicity of insoluble manganese dioxide dusts. *Arch Toxicol* **71**(12) 725-729.
- Nemmar A, Hoet PHM, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**, 411-414.
- Oberdörster G (2004). Emerging Concepts in Nanoparticle (NP) Toxicology. In: Nanotechnologies: a preliminary risk analysis on the basis of a workshop organized in Brussels on 1-2 March 2004 by the health and consumer protection directorate general of the European Commission, pp. 115-116.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **97**, 193-199.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004). Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhal Toxicol* **16**(6-7) 437-445.
- Oberdörster G (1996). Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhal Toxicol* **8** (Suppl) 73-89.
- Ostro B, Broadwin R, Green S, Feng WY, Lipsett M (2006). Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: results from CALFINE. *Environ Health Perspect*. **114**(1) 29-33.
- Owens DE 3rd, Peppas NA (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* **307**(1) 93-102.
- Penttinen P, Vallius M, Tiittanen P, Ruuskanen J, Pekkanen J (2006). Source-specific fine particles in urban air and respiratory function among adult asthmatics. *Inhal Toxicol*. **18**(3) 191-198.
- Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA (2006). Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol Sci* **91**(1) 159-165.
- Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL (2006). Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* **92**(1) 174-185.
- Shima H, Koike E, Shinohara R, Kobayashi T (2006). Oxidative ability and toxicity of n-hexane insoluble fraction of diesel exhaust particles. *Toxicol Sci* **91**(1) 218-226.
- Schwartz J (2000). Daily deaths are associated with combustion particles rather than SO(2) in Philadelphia. *Occup Environ Med* **57**(10) 692-697.

Schwartz J, Laden F, Zanobetti A (2002). The concentration-response relation between PM(2.5) and daily deaths. *Environ Health Perspect* **110**(10) 1025-1029.

Surkovic 5 (2005). UK views on research needs to enable risk assessment of nanomaterials. Workshop on the safety of nanomaterials, 7-9 December 2005, Washington, DC. <http://www.oecd.org/dataoecd/36/0/37274386.pdf>

Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL (2006). Pulmonary Instillation Studies with Nanoscale TiO₂ Rods and Dots in Rats: Toxicity is not Dependent Upon Particle Size and Surface Area. *Toxicol Sci* **91**(1) 227-236.

Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V (2002). Interactions between ultra-fine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* **184**(3) 172-179.

2. Conclusions et recommandations du groupe de travail

Lors de la dernière rencontre du groupe de travail à l'origine de cet ouvrage, un tour de table a permis à chacun d'exprimer les conclusions ou recommandations à privilégier ; voici un résumé des points présentés.

2.1. Contexte d'ensemble

- Les nanoparticules existent depuis toujours dans l'environnement humain (feux, émissions volcaniques, endotoxines...), et depuis des dizaines d'années pour certaines dans l'environnement industriel (noirs de carbone, fumées de soudage, silices ultra-fines, etc.). Elles ne font l'objet d'évaluations chiffrées que depuis très peu de temps.
- Dès ce stade, elles sont de natures extrêmement diverses (composition, taille, surface...) et présentent par conséquent des dangers potentiels variés.
- Ce qu'on connaît de leurs risques pour la santé humaine à partir de cette expérience limitée ne fournit pas de raison majeure pour les diaboliser en bloc, même si la vigilance reste nécessaire.
- L'approfondissement des connaissances montre cependant pour les PUF des propriétés toxicologiques spécifiques qui incitent à la prudence (dépôt majoré dans les voies respiratoires, réactivité plus grande, diffusion potentielle dans tout l'organisme...).
- Des applications nouvelles (biomédicales, par exemple) font apparaître de nouveaux types d'exposition et donc de risques.

- La possibilité d'un effet à distance du point d'entrée dans l'organisme doit être prise en compte pour toutes les nanoparticules, que leur taille rend susceptibles de se répandre dans tout l'organisme. Des risques potentiels sont repérés pour le système cardiovasculaire, le système nerveux.
- Le contexte professionnel incite aussi à la prudence : expositions à des substances de nature nouvelle, expositions plus accusées et plus fortement variables. L'utilisation de particules ultra-fines de substances déjà bien connues n'a pas toujours entraîné une mise à jour des mesures de prévention ou de précaution, alors que l'exposition a changé.

2.2. Identification des nanoparticules

La difficulté à avancer dans la compréhension de la toxicologie des particules ultra-fines réside dans le fait que les travaux sont souvent isolés (« chacun travaille dans son coin sur sa particule ») et menés avec des particules plus ou moins bien caractérisées.

Une caractérisation aussi complète que possible du matériau utilisé est donc fortement recommandée. Il faut connaître au mieux la nature chimique et les caractéristiques physiques des nanoparticules fabriquées ou manipulées (taille, surface, solubilité, forme, cristallinité, etc.). Ces données devraient être indiquées par les fabricants.

Il serait bon d'initier une banque de données et de matériaux de référence très bien caractérisés qui serviraient de témoins pour les travaux scientifiques (entre autres : nanotubes de carbone, PUF de TiO_2 , quelques nanocristaux fluorescents).

2.3. Suivi des nanoparticules (« traçabilité »)

On doit s'efforcer de répondre aux questions suivantes :

- D'où viennent-elles, où sont-elles utilisées et de quelle manière, que deviennent-elles ?
- Quelle est leur accessibilité dans le produit fini (au niveau de la fabrication, de l'utilisateur ou consommateur, de la fin de vie du produit) ?
- Ces nanoparticules seront-elles recyclées, et si oui, dans quelles conditions ?
- Peuvent-elles présenter des risques pour l'environnement ?

2.4. Métrologie

- Déterminer les populations professionnelles exposées aux nanoparticules, depuis les laboratoires jusqu'aux grandes entreprises.

- Quels paramètres utiliser pour évaluer leur concentration atmosphérique ? Les paramètres actuels sont inadaptés aux PUF, il faut en inventer de nouveaux. Une piste serait d'évaluer les quantités qui se déposent dans les voies respiratoires, notamment dans le poumon profond.
- Malheureusement, ces questions restent encore une affaire de spécialistes, tant pour la réalisation de la mesure que pour l'interprétation des résultats.
- Même si l'on emprunte des voies nouvelles, il faudra veiller à préserver une continuité minimale dans nos manières d'exprimer les résultats, pour ne pas perdre nos acquis, conserver des points de référence et de comparaison, et mieux caractériser les évolutions.

2.5. Risques toxicologiques

- Nécessité d'une approche substance par substance, et non pas « toutes nanoparticules confondues ».
- Quels paramètres utiliser pour évaluer leur activité biologique ? (concentrations en masse, en nombre, en surface disponible... ?). Il faut être très clair sur le paramètre utilisé et sur l'indicateur biologique retenu (une protéine, un essai fonctionnel respiratoire, l'importance d'un dommage à un organe déterminé...).

2.6. Prévention, précaution

- Les connaissances suffisent pour adopter le principe-clé : « Ne pas attendre avant d'agir ».
- Améliorer la formation des préventeurs. Les rendre acteurs et utilisateurs de la « traçabilité ». Quels sont les meilleurs messages à leur faire passer ?
- Précaution : mesures générales applicables à tout type de PUF ; prévention : adaptée produit par produit, en fonction de l'expérience spécifique acquise.
- Pour les utilisations de PUF en médecine ou en cosmétologie, les producteurs devraient dire ce qu'ils introduisent dans la formulation et ce qu'ils savent des risques et précautions à respecter.
- Associer aussi étroitement que possible la médecine du travail à la détection et au suivi des risques de l'exposition professionnelle aux nanoparticules.
- Même si ce n'est pas un aspect abordé par ce travail, il faut prendre en compte des risques pour les utilisateurs (consommateurs) et pour l'environnement. Attention également aux activités de recyclage, pas toujours très encadrées...

Mesures administratives ou réglementaires

- Valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) : on ne sait pas toujours quel paramètre utiliser pour évaluer la toxicité, il est donc difficile de définir des valeurs de référence. Il faudra sans doute introduire de nouveaux repères, mais on ne sait pas encore bien lesquels. Ne pas oublier qu'il existe déjà des VLEP dans certains cas (fumées de soudage, silices amorphes, noirs de carbone, fumées de zinc...).
- Puisque, d'une façon générale, les nanoparticules sont plus toxiques que les microparticules (pour une même substance), elles devraient être considérées, du point de vue de la réglementation (REACH), comme des substances nouvelles.

2.7. Besoins de recherches

Les connaissances directement applicables aux nanoparticules étant limitées, les besoins de recherches sont immenses et sont recensés dans une partie spécifique (voir ci-après, partie « Pistes de recherches en hygiène et sécurité au travail »). Deux points ont été soulignés lors des échanges du groupe :

- besoin d'études et recherches en métrologie de l'exposition (absence de points de repères, nécessité de faire progresser les données et les instruments métrologiques, grande diversité des paramètres possibles). Relire à ce sujet les conclusions proposées au chapitre 2, point 3 ;
- peut-on imaginer une démarche pour adapter les valeurs limites actuelles à des nanoparticules des mêmes matériaux ?

3. Pistes de recherches en hygiène et sécurité au travail

B. Hervé-Bazin

Les références utilisées ne sont pas systématiquement citées, plusieurs traitant des mêmes points généraux. Le domaine environnemental n'est pas traité.

Des voix de plus en plus nombreuses font valoir que la part consacrée aux recherches d'effets adverses possibles des nanotechnologies sur la santé humaine et l'environnement est insuffisante au point de risquer d'entraîner des réactions de rejet semblables à celles observées en Europe pour les organismes génétiquement modifiés. Globalement, cette part de recherche ne représente, aux États-Unis, que 3,9 % du budget nanotechnologies. Le centre Wilson a compilé dans une base de données plus de 350 études, menées aux États-Unis, au Royaume-Uni, au Canada, en Allemagne et à Taïwan ; il y apparaît

un manque majeur sur le thème de la sécurité des lieux de travail (Service, 2005). Les propositions évoquées ci-après sont des pistes dont la pertinence devra être appréciée et, au besoin, révisée au fur et à mesure de l'avancement des connaissances toxicologiques et des développements techniques.

Note. Le centre Wilson, créé en 1968 en mémoire du président des États-Unis Woodrow Wilson, est dédié à une harmonisation et un enrichissement mutuel entre formations scientifiques et choix politiques.

3.1. Améliorer la connaissance des procédés de fabrication et des produits fabriqués

- Développer la caractérisation des PUF, dont leur tendance à l'agglomération et ses conséquences.
- Améliorer les connaissances des traitements de surface utilisés pour les PUF, et les méthodes pour les observer et pour mettre en évidence les évolutions des propriétés.
- Savoir mieux caractériser les molécules adsorbées à la surface de nanoparticules et les surfaces correspondantes (taux de recouvrement, caractéristiques telles que plan cristallographique, zones de défauts, pores et leurs dimensions...).
- Étudier les risques de relargage des PUF à partir de formulations complètes (y compris après inclusion dans une matrice polymère) au long de la durée de vie du produit (jusqu'au recyclage, ou après mise à la décharge). Ceci implique de veiller à la traçabilité des produits finis.
- Mettre au point des échantillons de référence de nanoparticules aux caractéristiques bien établies (taille, forme, durabilité, composition, réactivité de surface...), qui puissent servir à la métrologie, la caractérisation, et l'évaluation de l'exposition et du risque (notamment pour des études comparatives en toxicologie ; UK, 2005)
- Évaluer les performances réelles des dispositifs de protection.

3.2. Améliorer nos capacités métrologiques et nos connaissances techniques

- Développer la caractérisation des aérosols de PUF et les outils pour mesurer les expositions. Définir les paramètres à mesurer pour caractériser les expositions, si possible de manière à pouvoir utiliser les résultats dans l'avenir, et à favoriser l'harmonisation. Autrement dit : « s'assurer de produire des résultats comparables, répétables, acceptés par la communauté scientifique, et sur lesquels on peut se fonder pour l'identification, l'évaluation et la gestion du risque. » (UK, 2005).

Étudier les possibilités d'automatisation partielle ou totale des caractérisations les plus difficiles ou les plus utiles, et leur validité.

- Préciser à court terme une nomenclature propre aux PUF (des aérosols correspondants, distribution granulométrique, comment tenir compte de l'agglomération, nommer des nanoparticules composées, etc.). Plusieurs groupes de travail y réfléchissent actuellement, à différents niveaux.
- Vérifier les caractéristiques de filtration des PUF les plus petites (< 5 nm).
- Développer des méthodes de mesurage simples, rapides, peu coûteuses, et compatibles avec une évaluation postérieure du risque. Développer et produire des méthodes et instruments abordables pour mesurer masse, surface, et taille (et distribution) des PUF. « Il est important d'être clair sur ce qui doit être mesuré, pourquoi telle métrique a été retenue, et comment elle doit être mise en œuvre. Il est possible que les métriques les plus appropriées ne soient pas les mêmes pour des PUF différentes, par exemple la surface pour des PUF et le nombre pour des nanotubes. » (UK, 2005).
- Améliorer les méthodes de dosage des PUF, notamment à faibles doses (y compris en nombre).
- Définir les limites de détection et de quantification des méthodes, les interférences possibles.
- Développer et/ou valider des stratégies de mesures des expositions aux PUF.
- Constituer des bases de données d'exposition professionnelle sur tous types de PUF et pour tous procédés de production (notamment en phase gazeuse), utilisation, ou autre.
- Étudier dans plusieurs secteurs industriels la variabilité de la composition des PUF (y compris spéciation) en fonction de leur taille, de la profondeur d'examen, du procédé de fabrication.

Une revue des besoins dans ce domaine a été publiée par Phalen et Hoover (2006), portant notamment sur les points suivants : établissement et validation de modèles dosimétriques (11 propositions) ; mieux comprendre les nanoparticules et les aérosols complexes (8 propositions) ; questions biologiques et effets sur la santé (9 propositions) ; autres priorités (4 propositions).

3.3. Développer les connaissances toxicologiques

Phases préliminaires

- Caractériser complètement les nanoparticules étudiées (indépendamment des données fournies par le producteur ou importateur), ainsi que leur possible évolution

dans le milieu (par exemple leur surface ou leur granulométrie a pu être modifiée). Préciser au moins la granulométrie, l'agglomération, la forme, la structure cristalline, la composition chimique (globale et spatiale), la surface spécifique, les charges de surface, et la porosité.

Note. Cette proposition doit bien figurer ici : comme montré en plusieurs occasions, la caractérisation des particules faisant l'objet d'études toxicologiques est souvent insuffisante, ce qui rend difficile l'interprétation ou la comparaison des résultats (voir UK, 2005, paragraphe 127).

- Préciser également les méthodes de préparation des échantillons (milieux et méthodes de dispersion, agglomération dans ce milieu).

Contenu des études

- Approfondir la toxicologie des PUF les plus répandues sur le marché, en particulier des silices ultra-fines (pyrogénées, colloïdales), du dioxyde de titane et de l'oxyde de zinc ultra-fins (utilisés en cosmétique), des nanotubes et des fullérènes (et leurs dérivés les plus courants, si nécessaire). Une priorité pourrait concerner les PUF pour lesquelles l'exposition est « délibérée » (applications médicales et paramédicales ; UK, 2005).
- Préciser les effets aigus et les effets à long terme de PUF définies.
- Déterminer les voies d'absorption, les organes cibles et les modes d'action, en lien avec les caractéristiques physiques et chimiques des PUF (masse, nombre, surface, substances adsorbées, solubilité, taille des particules, forme et facteur de forme, cristallinité, potentiel ζ , composition, agrégation/désagrégation...). Faire le point spécifiquement sur des organes cibles de première importance (cerveau, poumons, foie, rate, reins, cœur par exemple).

Sur le plan des essais toxicologiques en particulier, il est important de se référer aux analyses et propositions détaillées d'Oberdörster et coll. (2005).

- Suivi spécifique de l'état de santé de travailleurs impliqués dans la fabrication ou l'utilisation de PUF. Un suivi particulier devrait être envisagé pour les applications médicales des PUF.

Interprétation/Relecture des études

- Préciser et comprendre les mécanismes généraux qui gouvernent la distribution des PUF dans l'organisme (voies cellulaires ou paracellulaires). Faire un point détaillé sur le danger d'un passage transplacentaire et ses éventuelles conséquences.
- Peut-on différencier l'action des PUF attribuable à leur solubilisation de celle attribuable à leur état particulaire ?

- Confier à un groupe de travail l'examen détaillé du risque de passage percutané des PUF et dire si, oui ou non, et dans quelles conditions, les PUF peuvent traverser cette barrière. En l'absence de conclusions claires, continuer à étudier ces possibilités de passage, notamment en fonction de la taille, de la nature, et des revêtements de surface, ainsi que sous l'influence de flexions répétées.
- Étude fine des mécanismes de la translocation, des paramètres qui la gouvernent, et de ses conséquences, notamment pour les organes les plus perfusés.
- Existe-t-il des mécanismes particuliers d'endocytose pour les PUF ? Comment les PUF se distribuent-elles à l'intérieur de la cellule, en fonction de leurs caractéristiques ? Quels facteurs favorisent un transport transcellulaire ou intracellulaire ? Quelle est l'influence de la taille, de la réactivité de surface ?
- Quels facteurs favorisent la désagrégation des PUF *in vivo* ? Quelles sont les implications de possibles désagréations/agrégations de PUF *in vivo* ?
- Réalité et importance des conséquences des traitements de surface intentionnels des PUF. Étudier leur durabilité *in vivo*. Modulation des propriétés par d'autres molécules adsorbées en milieu réel.
- Étudier s'il est possible d'extrapoler les propriétés toxicologiques de PUF à partir de particules de même composition mais de dimensions non nanométriques, et entre particules de tailles différentes.
- Comment repérer rapidement celles des PUF qui auraient tendance à la bioaccumulation ?
- Facteurs et conséquences de la solubilité/insolubilité *in vivo* des PUF. En deçà de quelle taille cette question n'aurait-elle plus de sens ?
- Mieux comprendre les apports et limites des études *in vitro* par rapport aux études *in vivo*. Pourrait-on gagner du temps sur l'évaluation des dangers de PUF sans ajouter trop d'incertitude sur la fiabilité d'une telle évaluation ?
- Meilleure connaissance de la variabilité des effets et réponses inter-espèces et de ses causes. Amélioration des connaissances pour la transposition inter-espèces.
- Certaines PUF pourraient-elles présenter un potentiel allergisant ou irritant renforcé par rapport aux particules de dimensions plus usuelles ?

Diffusion, valorisation

- Diffuser, par tout moyen approprié, les connaissances relatives à la toxicologie des PUF. Favoriser séminaires et rencontres d'échanges d'informations, d'expérience, et de relecture des données scientifiques.

3.4. Développer des mesures de prévention adaptées aux PUF

L'un des buts du présent ouvrage est d'effectuer une synthèse des connaissances relatives aux PUF, dans le but de mieux discerner quels paramètres en régissent le plus souvent la toxicité, ce qui devrait contribuer à orienter les mesures de prévention ou de précaution. Ce travail et d'autres, complémentaires (voir annexe), inspire les suggestions suivantes, dont certaines se feront plus précises ou seront adaptées en fonction de l'évolution des connaissances et des matériaux considérés.

- Étudier la possibilité de demander une déclaration de fabrication de PUF, et sous quelles conditions, en particulier si elles sont commercialisées. Étudier également la possibilité d'une déclaration (nature et quantité) dans le cas de PUF formulées non fixées dans une matrice.
- Vérifier la validité ou les points faibles des mesures générales et particulières de prévention appliquées aussi bien à la fabrication qu'à la mise en œuvre de PUF largement utilisées (noirs de carbone, dioxyde de titane, oxyde de zinc, silices dites amorphes), en développement (nanotubes de carbone, fullérènes, par exemple) ou même entièrement nouvelles. Dans un premier temps, l'accent sera mis sur l'évaluation de l'exposition professionnelle (voies pulmonaire, cutanée, orale). Que sait-on de l'efficacité des EPI dans le cadre des PUF ?
- Instituer un suivi médical spécifique (examen d'embauche, suivi en cours d'exercice, suivi post-professionnel) pour les personnes professionnellement exposées aux particules ultra-fines. Veiller à ce que les données recueillies soient pertinentes et exploitables ultérieurement, notamment du point de vue épidémiologique.
- Réfléchir à la nécessité et la possibilité de définir des valeurs limites provisoires d'exposition professionnelle opérationnelles pour les PUF (génériques ou au cas par cas, selon l'avancement des connaissances).
- Faire un point sur l'utilisation de PUF dans le monde médical : types de PUF, modalités d'utilisation, quantités manipulées, précautions prises, incidents, plaintes ou suggestions, etc.
- Faire un point sur toutes les PUF utilisées dans des applications ou articles impliquant un risque notable de contact avec les consommateurs ou l'environnement (facilité de relargage, intensité du contact, devenir en fin de vie du produit, recyclage éventuel et ses conditions...).
- Considérer que toute information relative à l'hygiène ou la sécurité des PUF relève du domaine public (tout en veillant au respect du secret de fabrication).

- Envisager de traiter les PUF comme des substances nouvelles, voire instaurer un système « nano-REACH ». Cette proposition est clairement recommandée par le Comité de la prévention et de la précaution (CPP, 2006 ; voir entre autres les pages 35-37).
- Dans quelles conditions faut-il s'inquiéter d'un éventuel pouvoir explosif de PUF ?
- Encourager de bonnes pratiques d'utilisation (par exemple en vase clos plutôt qu'à ciel ouvert, en milieu aqueux plutôt qu'à sec, en paillettes agglomérées plutôt qu'en poudre...) et les faire connaître.
- Exactitude et efficacité des FDS dans la communication des risques des PUF et la mise en œuvre de mesures de prévention.
- D'ici 3 à 4 ans, faire un point des recommandations effectuées, actions entreprises et leur efficacité, ainsi qu'un point relatif aux développements récents et leurs conséquences potentielles, et s'ils semblent nécessiter une adaptation des recommandations.

3.5. Optimiser nos stratégies de résolution de difficultés

- Favoriser la multidisciplinarité, y compris entre scientifiques de diverses spécialités et « politiques », « verts », « organisations non gouvernementales », ou encore « législateurs ». Favoriser les échanges entre les domaines environnementaux et du travail. Harmoniser le plus possible les méthodes de mesurage et les techniques d'interprétation des résultats (y compris avec l'aide de modèles mathématiques et statistiques).
- Faire participer l'Industrie à la détection, la caractérisation, l'étude et la résolution de difficultés liées aux PUF (sans lui abandonner la responsabilité unique des décisions à prendre). Lui demander de faire connaître les mesures qu'elle applique pour minimiser les risques, et comment elle en objective l'efficacité.
- Assurer la plus grande transparence possible aux processus de décision.
- Faire effectuer régulièrement des bilans (actions décidées, mise en œuvre, efficacité, échecs, ré-orientations...) par une (ou des) organisation(s) indépendante(s) et les publier.

Dans cet axe de réflexion, il faut citer le travail important réalisé par le Conseil international pour la gouvernance des risques (International Risk Governance Council ; IRGC, 2006). Des suggestions et recommandations sont faites aux parties prenantes (universités, Industrie, gouvernements, organisations internationales ; voir notamment page 65 et les annexes du rapport IRGC), qui recoupent et complètent utilement la présente

approche. À citer également les réflexions « stratégiques » telles que celles du BAUA (BAUA, 2006), qui propose vingt-cinq thèmes de travail répartis en trois axes : exposition et métrologie (huit thèmes), évaluation toxicologique et écotoxicologique (vingt-six thèmes), débats sur les nanotechnologies.

Bibliographie

- Agence nationale de la recherche – Programme Santé-Environnement Santé-Travail, 1^{er} appel à projets de recherche, mai 2005.
- BAUA (2006). Nanotechnology: health and environmental risks of nanoparticles – Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (Federal Institute for Occupational Safety and Health). Research strategy. Draft, August 2005, 41 pages. http://www.baua.de/nn_47716/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/Nanotechnologie/pdf/draft-research-strategy.pdf
- CE (2005). Nanotechnology – Proceedings of the Workshop: *Research Needs on Nanoparticles*, held in Brussels, 25-26 January 2005, 96 pages. Édité par R. Tomellini et C. de Villepin.
- IRGC (2006). International Risk Governance Council – White paper on nanotechnology risk governance. June 2006, 103 pages. http://www.irgc.org/irgc/_b/contentFiles/IRGC_white_paper_2_PDF_final_version.pdf
- CPP (2006). *Nanotechnologies, nanoparticules. Quels dangers, quels risques ?* Comité de la prévention et de la précaution & Ministère de l'écologie et du développement durable, Paris, mai 2006, 64 pages.
- Mark D (2004). Nanomaterials: a risk to health at work? Proceedings of the first international symposium on occupational health implications of nanomaterials, 12-14 October 2004, Buxton, Derbyshire, UK, 156 pages.
- NNI-ChI CBAN ESH Working Group. Recommended Topics for R&D Activities http://www.chemicalvision2020.org/pdfs/cban_recommendedtopics.pdf
- Oberdörster G, Maynar A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H, and A report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle Fibre Toxicol* **2**, 8.
- Ostiguy C, Lapointe G, Ménard L, Cloutier Y, Trotter M, Boutin M, Antoun M, Normand C (2006). Les nanoparticules. Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et sécurité du travail. IRSST, rapport R-455, 78 pages.
- Phalen RF, Hoover MD (2006). Aerosol dosimetry research needs. *Inhal Toxicol* **18**, 841-843.
- SCENIHR (2005). Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks – Opinion on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies, SCENIHR/002/05, adopted by the SCENIHR during the 7th plenary meeting of 28-29 September 2005. 78 pages.
- Service RF (2005). Calls rise for more research on toxicology of nanomaterials. *Science* **310**, 1871.

The Royal Society & The Royal Academy of Engineering (2004). Nanoscience and nanotechnologies. Voir notamment le chapitre 10.

UK (2005). Characterising the potential risks posed by engineered nanoparticles. A first UK Government research report. Published by the Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA). 57 pages. <http://www.defra.gov.uk/environment/nanotech/nrcg/pdf/nanoparticles-riskreport.pdf>

Annexe – Quelques rapports sur les nanoparticules

Les rapports publiés sur les nanoparticules sont nombreux, sans doute en raison de l'immense étendue des champs ouverts aux recherches et aux applications potentielles, aux promesses parfois peu crédibles ou, au contraire, aux prédictions alarmistes, et à la nécessité qui en résulte, pour chaque État qui souhaite se situer sur la question, de procéder à sa propre évaluation des dangers et des risques, ne serait-ce que pour se faire par lui-même une idée des enjeux, et des domaines dans lesquels il pourrait investir.

La liste qui suit, bien que volontairement limitée aux rapports scientifiques d'un certain volume, ne prétend pas à l'exhaustivité. Nous espérons qu'elle pourra rendre service à ceux qui voudraient diversifier ou approfondir leurs sources d'information.

Académie des sciences et Académie des technologies (2004). *Nanoscience - Nanotechnologies*. Éditions Tech & Doc, 480 pages.

AFSSET (2006). Les nanomatériaux. Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. Rapport de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, juillet 2006, 248 pages.

Aitken RJ, Creely KS, Tran CL (2004). "Nanoparticles: An Occupational Hygiene Review." Research Report 274. London: U.K. Institute of Medicine, 2004.

Anonyme (2004). Developing experimental approaches for the evaluation of toxicological interactions of nanoscale materials. Workshop, Nov. 3-4, 2004, Gainesville, Fl., 32 pages.

BIA (2004). BIA-Report 7/2003e. BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces", Carsten Möhlmann editor. 208 pages.

Biswas P, Wu CY (2005). Nanoparticles and the Environment, Critical Review Paper. *J Air Waste Manage Assoc* **55**, 708-746.

- CE (2004). Nanotechnologies: a preliminary risk analysis on the basis of a workshop organized in Brussels on 1-2 March 2004 by the Health and Consumer Protection Directorate General of the European Commission, 143 pages.
- CE (2005). Nanotechnology – Proceedings of the Workshop: *Research Needs on Nanoparticles*, held in Brussels, 25-26 January 2005, 96 pages. Édité par R. Tomellini et C. de Villepin.
- Comité de la prévention et de la précaution (2006). Nanotechnologies, nanoparticules. Quels dangers, quels risques ? Co-édité avec le Ministère de l'écologie et du développement durable, Paris, mai 2006, 64 pages.
- EPA (2005). U.S. Environmental Protection Agency. Nanotechnology white paper. December 2, 123 pages. http://cohesion.rice.edu/CentersAndInst/ICON/emplibrary/EPA_Nanotechnology_White_Paper_EXTER_NAL_REVIEW_DRAFT_12-1-05.pdf
- Feigenbaum D, Nsamirizi A, Sinclair-Desgagne B (2004). *Les nanotechnologies : leurs bénéfices et leurs risques potentiels*. Centre inter-universitaire de recherche en analyse des organisations (CIRANO), Montréal, série scientifique, 43 pages.
- Gijsbers JHJ, de Pater AJ, Snippe RJ, Arts JHE (2000). – Ultrafine particles in the workplace. TNO Report V 3045, 58 pages.
- Hahn FF, Barr EB, Ménache MG, Seagrave JC (2005). *Particle Size and Composition Related to Adverse Health Effects in Aged, Sensitive Rats*. HEI Research Report 129. Septembre 2005, 84 pages.
- Hett A (et collaborateurs non précisés) (2004). Nanotechnology – Small matter, many unknowns. Swiss Reinsurance Company (Swiss Re) P.O. Box 8022, Zurich. 53 pages.
- Hext PM, Rogers KO, Paddle GM (1999). *The health effects of PM_{2.5} (including ultrafine particles)*. CONCAWE, Brussels. Report n° 99/60.
- HSE (2004). A review of the toxicity of particles that are intentionally produced for use in nanotechnology applications, seen from an occupational health perspective. Health and Safety Executive, Industrial Chemicals Unit, July 2004, 41 pages.
- Lorrain JL, Raoul D (2004). Nanosciences et progrès médical. Rapport de l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et techniques, Assemblée nationale, mai 2004, n° 1588, 298 pages.
- Mark D (2004). Nanomaterials: a risk to health at work? Proceedings of the first international symposium on occupational health implications of nanomaterials, 12-14 October 2004, Buxton, Derbyshire, UK, 156 pages.
- Morawska L, Moore MR, Ristovski Z (2004). Health Impacts of Ultrafine Particles. Desktop literature review and analysis. Australian Government, Department of the Environment and Heritage, 311 pages. <http://www.deh.gov.au/atmosphere/airquality/publications/health-impacts/pubs/health-impacts.pdf>.
- NIOSH (2005). NIOSH Current Intelligence Bulletin: Evaluation of Health hazard and recommendations for occupational exposure to titanium dioxide. November 22, 2005, draft, 120 pages.
- Oberdörster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, Elder AC (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. Rapport de recherche n° 96 du Health Effects Institute, pp. 5-74 ; discussion pp. 75-86.
- Ostiguy C, Lapointe G, Trottier M, Ménard L, Cloutier Y, Boutin M, Antoun M, Normand C (2006). Les effets à la santé reliés aux nanoparticules. IRSST, rapport R-451, 48 pages.

- Ostiguy C, Lapointe G, Ménard L, Cloutier Y, Trottier M, Boutin M, Antoun M, Normand C (2006). Les nanoparticules. Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et sécurité du travail. IRSST, rapport R-455, 78 pages.
- Technological analysis. Industrial application of nanomaterials – Chances and risks. VDI Technologie-zentrum. W. Luther Editor. Future technologies No. 54, Düsseldorf, August 2004, 112 pages.
- The Royal Society and Royal Academy of Engineering. (2005). Nanoscience and nanotechnologies, opportunities and uncertainties. <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>. 94 pages.
- SCENIHR (2005). Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Opinion on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. SCENIHR/002/05, adopted 29 September 2005 (78 pages).
- UK (2005). Characterising the potential risks posed by engineered nanoparticles. A first UK Government research report. Published by the department for environment, food and rural affairs. 57 pages. <http://www.defra.gov.uk/environment/nanotech/nrcg/pdf/nanoparticles-riskreport.pdf>
- Wichmann HE, Spix C, Tuch T, Wölke G, Peters A, Heinrich J, Kreyling WG, Heyder J (2000). Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany. Part I, role of particle number and particle mass. HEI Report No. 98. Cambridge, MA, pp. 1-96.
- WHO (2003). Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. Report on a WHO Working Group, Bonn, Germany, 13-15 January 2003. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.

Table des abréviations

En gras, les abréviations les plus utilisées.

ACGIH	American Conference of Governmental Industrial Hygienists (États-Unis)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate (triphosphate d'adénosine)
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry (États-Unis)
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CAP	Concentrat de particules de l'air ambiant (Concentrated Air Particles en anglais)
CB	Noir de carbone (Carbon Black en anglais)
CIPR	Commission internationale de protection radiobiologique
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer (IARC en anglais)
CV	Coefficient de variation
DCFH	Dichlorofluorescéine
DEP	Débit expiratoire de pointe
EAA	Espèces activées de l'azote (Reactive Nitrogen Species, RNS en anglais)

EAO	Espèces activées de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS en anglais)
EDAX	Energy Dispersive X-ray Analysis (Spectrométrie X en dispersion d'énergie)
EPA	Environmental Protection Agency (États-Unis)
ET(G)	Écart-type (géométrique)
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HEI	Health Effects Institute (États-Unis)
Hb	Hémoglobine
IARC	International Association for Research on Cancer (CIRC en Français)
IC	Intervalle de confiance (IC95, intervalle de confiance à 95 %)
IL	Interleukine
INRS	Institut national de recherche et de sécurité
LIPSION	Nanosonde ionique à haute énergie (permet un examen à plus grande profondeur que le microscope électronique, jusqu'à 30 µm)
(L)LBA	(Liquide de) lavage broncho-alvéolaire
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level (niveau le plus faible entraînant un effet)
µ	Micro (µg : microgramme, etc.)
MA	Macrophage alvéolaire
MMAD	Mass Median Aerodynamic Diameter (diamètre aérodynamique médian en masse)
Nb, n	Nombre
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health (États-Unis)
nm	nanomètre (10 ⁻⁹ mètres, un millionième de millimètre)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (dose sans effet adverse observé)
NTC	Nanotubes de carbone en général
NTU	Nanotubes de carbone monofeuillet
NTD	Nanotubes de carbone à deux feuillets
NTP	Nanotubes de carbone à plus de deux feuillets
OMS	Organisation mondiale de la santé (WHO en anglais)
OSHA	Occupational Safety and Health Administration (États-Unis)

PED	Particules émises par les moteurs diesels
PEL	Permissible Exposure Limit (valeur limite admissible)
PIXE	Particle-Induced X-ray Emission (analyse par émission X induite, plus sensible que l'EDAX)
PLGA	Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (copolymère d'acides lactique et glycolique)
PM₁₀, PM_{2,5}, PM_{0,1}	Désignation conventionnelle de fractions particulaires d'aérosols (PM est l'abréviation de <i>Particulate Matter</i>) dont les diamètres aérodynamiques de coupure sont respectivement 10, 2,5 et 0,1 µm.
PMN	Polymorphonucléaire (ou polynucléaire neutrophile, souvent dit neutrophile seulement)
ppm	Partie par million (par exemple 1 µg/g ou 1 mg/kg)
PUF	Particule(s) ultra-fine(s)
RBS	Rutherford Backscattering Spectrometry
ROFA	Residual Oil Fly Ashes (cendres volantes de combustion d'huiles usées)
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène) – La notation adoptée en français pour cet ouvrage est EAO
RR	Risque relatif
SCCNFP	Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products (Comité scientifique pour les produits cosmétiques et non-alimentaires)
SIR	Standardized Incidence Ratio
SMR	Standardized Mortality Ratio
STIM	Scanning Transmission Ion Microscopy
TPA	Acétate de tétradécanoyle phorbol
UV	Ultra-violet
VLE	Valeur limite d'exposition à court terme (période de référence ≤ 15 min)
VLEP	Valeur limite d'exposition professionnelle (terme générique)
VME	Valeur limite de moyenne d'exposition (période de référence : en général 8 h)
WHO	World Health Organization (OMS en français)

NB : D'autres abréviations, moins utilisées, peuvent apparaître dans le texte ou certains tableaux, où elles sont explicitées.

Glossaire

Adduit

Espèce chimique formée par combinaison directe de deux entités moléculaires distinctes. Ceci peut entraîner un changement de la nature des liaisons chimiques de chacune des entités. En biologie, un adduit est un complexe qui se forme lorsqu'un agent chimique se lie avec une molécule biologique (ADN, protéine). Par exemple, un adduit à l'ADN peut en modifier la conformation et la fonctionnalité.

Aérosol

Suspension métastable de particules solides ou liquides dans un gaz.

Aérosol ultra-fin

Aérosol composé principalement de particules ultra-fines. Ce terme est souvent utilisé pour des particules formées par un procédé (particules secondaires), par exemple les fumées de soudage ou de combustion.

Agglomérat

Groupe de particules liées par des forces relativement faibles, par exemple électrostatiques et de tension superficielle. Ce terme est souvent utilisé de manière interchangeable avec « agrégat ».

Agrégat

Particule hétérogène dont les composants, liés par des forces importantes, ne peuvent être séparés facilement. Ce terme est souvent utilisé de façon générique, interchangeable avec « agglomérat ».

Axone

Prolongement long et mince d'un neurone, qui conduit les impulsions électriques en dehors du corps cellulaire. Les nerfs sont constitués de faisceaux d'axones, généralement entourés d'une gaine de myéline.

Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

Maladie des poumons et des bronches caractérisée par l'obstruction permanente de ces dernières. La BPCO recouvre la bronchite chronique et l'emphysème. Elle expose à l'essoufflement à l'effort et à l'insuffisance respiratoire ; les voies aériennes sont plus étroites : parois épaissies, inflammatoires et encombrées de sécrétions. Le tabagisme est le principal (90 %) facteur de risque de la BPCO, mais elle peut résulter d'expositions professionnelles (mineurs, fonderies, bâtiment, industrie textile, agriculteurs...).

Carbon black/Black carbon

Ces dénominations proches désignent le plus souvent des espèces chimiques d'origines différentes.

Le **carbon black** (CB) est formé de particules de carbone amorphe résultant de la combustion incomplète d'hydrocarbures ou de mélanges d'hydrocarbures dans des conditions définies. Les particules primaires ont des tailles de 15 à 300 nm, et forment des agrégats (environ 85 à 500 nm) puis des agglomérats (environ 1 à plus de 100 µm). Fabriqué à l'échelle industrielle, il sert notamment à renforcer le caoutchouc.

Le **black carbon** est également un produit de combustion incomplète, mais essentiellement d'origine végétale (par exemple les feux de forêt ou combustibles fossiles). Les particules sont de formes moins régulières, ne s'agglomèrent pas du fait de leur dilution dans l'atmosphère, et contiennent plus d'impuretés que le carbon black. Le black carbon est ubiquitaire (sols, glaciers, sédiments, atmosphère) et peut aider à la datation des couches géologiques dans lesquelles il est présent.

Cas croisés ou cas-témoins croisés (études- ; anglais : *case-crossover*)

Ce schéma d'étude épidémiologique compare les caractéristiques d'une période de temps où s'est produit un événement (le « cas » ; généralement, une journée bien définie) à celles d'une période équivalente pendant laquelle il ne s'est rien passé chez le même individu. Les jours cas et les jours témoins sont appariés, plusieurs jours témoins pouvant être utilisés pour un jour cas, pour augmenter la puissance de l'étude.

Cavéole

Petite invagination vésiculaire de la membrane plasmique, de 50 à 100 nm de diamètre. Un des constituants essentiels de cet organite est la cavéoline, une protéine de 21-22 kDa, organisée en épingle à cheveux, formant des oligomères et capable de lier le cholestérol. Leur grande abondance, notamment dans les adipocytes et les cellules endothéliales, laisse penser qu'elles ont une fonction très importante. Dès les années 1950, il a été proposé que, dans les cellules endothéliales, les cavéoles étaient responsables du passage de solutés de la lumière des vaisseaux vers les tissus voisins par « transcytose ».

Chimiokines (anglais : *chemokines*)

Mot-valise formé à partir de chimio(taxie) et (cyto)kines. Les cytokines sont de petites molécules (8 à 30 kDa), souvent glycosylées, qui jouent un rôle essentiel dans la différenciation, l'activation et la prolifération cellulaire. Elles sont produites par de nombreuses cellules, notamment les macrophages alvéolaires. Elles jouent un rôle chimiotactique envers les cellules inflammatoires et immunocompétentes, notamment les leucocytes. Plus de quarante ont été décrites, réparties en deux familles.

Chimiotaxie, chimiotactisme (anglais : *chemotaxis*)

Mouvement d'une cellule ou d'un organisme se dirigeant vers ou s'éloignant d'une substance en réponse à son gradient de concentration. Par exemple, les polynucléaires neutrophiles migrent à travers les parois des capillaires et les espaces intercellulaires en direction d'un foyer d'infection, détectant un gradient de concentration d'un composé attractif (peptide) agissant à des concentrations très faibles.

Clairance (ou épuration)

Coefficient d'épuration plasmatique brute d'un corps, par voie extrarénale aussi bien que rénale (arrêté du 2 janvier 1975, J.O. du 16 janvier 1975). En toxicologie pulmonaire, la clairance désigne l'élimination de particules déposées sur l'épithélium pulmonaire ; elle peut être exprimée en quantité ou proportion de matière éliminée par unité de temps.

Cluster

Mot d'origine anglo-saxonne désignant un regroupement d'entités selon un ou plusieurs critères ; son acception peut varier selon le domaine technique qui l'utilise (informatique, statistique, physicochimie...). Un cluster de particules ultra-fines désigne un agrégat ou un agglomérat.

Cohorte

Groupe constitué d'individus partageant une ou plusieurs caractéristiques définies, comme l'exposition ou la non-exposition à un toxique, une tranche d'âge, ou encore des caractéristiques sociologiques ou économiques. Ce groupe est suivi dans le temps.

Controlatéral (ou contralatéral)

Du côté opposé. Antonyme : ipsilatéral.

CVF (capacité vitale forcée)

Volume d'air exhalé au cours d'une expiration effectuée aussi fort et aussi complètement que possible, en partant de la position d'inspiration complète.

Cytokines

Outre les médiateurs et les hormones, l'organisme utilise, pour s'adapter à son environnement, des facteurs de croissance, d'involution et de défense de son intégrité, que l'on peut désigner sous le terme général de cytokines. Il s'agit de molécules polypeptidiques

solubles, de faibles masses moléculaires, glycosylées ou non, libérées plus ou moins spécifiquement par certaines cellules, et agissant à des concentrations très faibles.

Les cytokines ont une action soit autocrine (c'est-à-dire sur la cellule sécrétrice elle-même), soit paracrine (sur les cellules voisines), soit parfois endocrine (à distance après transport par le sang).

Chaque cytokine peut être produite par différents types de cellules et agir sur différents types de cellules. Plusieurs cytokines peuvent avoir des fonctions assez semblables. L'action d'une cytokine est généralement dépendante de celle d'une ou de plusieurs autres.

Les cytokines inflammatoires les plus fréquemment suivies sont les interleukines 1, 6 et 8 (IL-1, IL-6, IL-8) ainsi que le facteur de nécrose tumorale alpha (*Tumour Necrosis Factor*, TNF).

DEP (débit expiratoire de pointe)

Débit instantané maximal atteint lors d'une expiration forcée exécutée à partir de la position d'inspiration complète. La valeur moyenne pour un adulte est de 10 litres/seconde.

Desferrioxamine

La desferrioxamine B est un complexant d'origine naturelle (un hydroxamate produit par *Streptomyces pilosus*, masse molaire 560) de différents métaux de transition, particulièrement du FeIII. La constante de stabilité avec le FeIII est proche de 10^{31} (« seulement » 10^7 avec le FeII, et de l'ordre de 10^{10} à 10^{15} avec les autres métaux de transition, 10^{23} avec Al^{+++}). Une fois combinée avec le fer, on l'appelle ferrioxamine.

La desferrioxamine a reçu de nombreux noms ou orthographes différents.

Efficacité d'un filtre

Pourcentage de particules retenues en nombre par un filtre dans des conditions définies (débit, concentration, granulométrie donnés), souvent mesuré avec des particules tests (phtalate de diéthylehexyle, chlorure de sodium). Si le débit d'air amont est égal au débit d'air aval, l'efficacité E est donnée par la rapport des concentrations (en masse ou en nombre) aval et amont.

Efflux

Flux sortant, par opposition à un flux entrant (influx ou afflux).

Eicosanoïdes

Nom générique de lipides à 20 atomes de carbone (*eicosa* signifie « 20 » en grec) dérivés des acides arachidonique ou eicosapentaénoïque ; ils interviennent dans pratiquement toutes les réactions d'inflammation. On distingue les prostaglandines, thromboxanes, leukotriènes, et prostacyclines ; tous ont une très forte activité biologique (« super-hormones »), positive ou négative.

Endotoxine

Toxine bactérienne thermostable libérée par la lyse ou la croissance des bactéries Gram négatives. Il s'agit d'un lipopolysaccharide (ou LPS, lipide complexe auquel est attaché un polysaccharide), constituant essentiel de leur paroi, qui peut provoquer chez l'homme des troubles graves (fièvre, chute de tension).

Épithélium

Feuillet mono- ou pluri-cellulaire qui recouvre un organe ou tapisse une cavité. Les cellules sont maintenues les unes contre les autres par des jonctions spéciales. Elles présentent une surface externe (dite apicale), munie de microvillosités, et une surface basale, en contact avec le tissu conjonctif. L'épithélium est habituellement protecteur ; il est parfois glandulaire et émet des substances chimiques.

Espèces activées de l'oxygène (EAO)

Les dysfonctionnements du métabolisme de l'oxygène sont à l'origine d'une production excessive d'espèces chimiques très réactives dites « espèces activées de l'oxygène » (EAO, ou « espèces réactives de l'oxygène », ERO), dont des radicaux libres (comme le radical hydroxyle $\text{HO}^\bullet$, le plus agressif, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{RO}^\bullet$) et des produits non radicalaires (comme H_2O_2 , ROOH). Ces espèces, en particulier les espèces radicalaires, endommagent des macromolécules biologiques (ADN, lipides, protéines), perturbant ainsi le fonctionnement cellulaire (hyperprolifération, apoptose, mutation...). Ces phénomènes de « stress oxydant » sont impliqués dans de nombreuses pathologies (athérosclérose, diabète, maladies neurodégénératives, cancer...) et dans les processus de vieillissement.

Facteur de confusion

Terme utilisé en épidémiologie. Facteur associé à la fois au paramètre d'intérêt (comme l'exposition à un toxique donné) et à l'affection suivie (par exemple cancer du poumon), il provoque une distorsion de l'estimation de l'association entre les deux ; celle-ci est due à une distribution différente de ce facteur entre les groupes exposés et non exposés, ou entre les cas et les témoins. Pour être un facteur de confusion, une variable doit être :

- associée à l'exposition mais ne pas en être une conséquence ;
- associée à l'affection indépendamment du paramètre d'intérêt.

Un facteur de confusion à évaluer systématiquement dans le suivi des cancers pulmonaires est le tabagisme.

Fibrose

Hyperplasie conjonctive (prolifération de fibroblastes, myofibroblastes et synthèse de fibres collagènes). Elle est caractérisée par un durcissement (sclérose) avec perte d'élasticité. La fibrose pulmonaire se manifeste par la formation anormale de tissus cicatriciels d'apparence fibreuse, pouvant aller jusqu'à un épaississement et un raidissement des tissus pulmonaires. Le malade éprouve alors de la difficulté à respirer et s'essouffle au moindre effort. La maladie peut évoluer graduellement ou rapidement, ou bien se stabiliser.

Fractal, fractale

Mot inventé par Benoît Mandelbrot en 1974 (du latin *fractus*, brisé). On nomme fractale (nom féminin) une courbe ou surface de forme irrégulière ou morcelée créée en suivant des règles déterministes ou stochastiques. Un objet fractal présente les mêmes motifs structurels, quelle que soit l'échelle à laquelle il est observé. Les fractales sont notamment utilisées pour la modélisation d'objets de formes irrégulières.

Gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT)

Marqueur de cytotoxicité, indicateur du LLBA (fluide extracellulaire) en général plus sensible au dommage cellulaire que la lactate déshydrogénase (LDH).

Granulome

Masse inflammatoire de petite taille due à la prolifération dans un tissu d'un certain nombre de cellules de défense dérivées des globules blancs du type monocyte (macrophages, cellules épithélioïdes, cellules géantes), entourées d'une couronne de globules blancs du type lymphocyte. Elle résulte généralement d'une réaction localisée à la présence d'un agent infectieux ou d'un corps étranger. Bien que non spécifique d'une maladie, on ne la trouve que dans un petit nombre d'affections (« granulomatoses », notamment dans la tuberculose et la sarcoïdose ; voir par exemple http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/D1/Ana_Path/Inflammation_Granulomateuse_Presentation.pdf).

Hydrophile/Hydrophobe

Hydrophile : qui a une affinité pour l'eau. L'antonyme est hydrophobe.

Hyperplasie

Accroissement anormal du nombre de cellules d'un organe ou d'une partie d'organe (ex. : hyperplasie bénigne de la prostate).

Interleukines

Médiateurs chimiques solubles, sécrétés par les macrophages et certains lymphocytes, qui stimulent d'autres cellules immunitaires. Leur action se fait en cascade (IL-1 ; IL-2 ; IL-6 ; IL-12). L'interleukine 2 notamment joue un rôle important dans la régulation du système immunitaire : elle stimule les lymphocytes T dont la multiplication va amplifier la réponse de l'organisme.

Interstitium

L'interstitium pulmonaire désigne le tissu conjonctif qui soutient les axes bronchovasculaires, les cloisons interlobulaires, le tissu sous-pleural et les cloisons interalvéolaires. Ce tissu est modifié lors des pneumopathies interstitielles diffuses, soit par une infiltration cellulaire, un œdème, soit par des anomalies qualitatives ou quantitatives du collagène de soutien de la matrice extracellulaire.

Intratrachéal

À l'intérieur de la trachée.

In vitro, in vivo

Expressions tirées du latin, signifiant respectivement « dans le verre » et « chez le vivant ». La première se réfère aux expérimentations, acellulaires ou en présence de cellules, effectuées dans du matériel de laboratoire (généralement en verre) ; la seconde désigne le plus souvent l'expérimentation chez l'animal entier.

Ipsilatéral

Du même côté (synonyme : homolatéral).

Ischémie

Arrêt de l'irrigation sanguine d'un organe ou tissu.

Kelvin (degré-)

Désignation d'une température dans l'échelle absolue des températures, c'est-à-dire par rapport au zéro absolu ($-273,15^{\circ}\text{C}$), où il n'y a aucun mouvement par agitation thermique. $\text{K} = ^{\circ}\text{C} + 273,15$ (on n'écrit pas $^{\circ}\text{K}$, mais seulement K).

Lactate déshydrogénase (LDH)

Enzyme du cytoplasme catalysant la réduction réversible du pyruvate en lactate (transfert des hydrogènes apportés par le coenzyme). Protéine de 140 000 daltons (4 chaînes d'acides aminés) avec cofacteur (zinc) et coenzyme (NADH/NAD⁺). Sa présence dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire indique des atteintes des cellules épithéliales (cytolyse).

Lamina propria

Sous-couche de l'épithélium constituée des tissus conjonctifs (cellules conjonctives, fibres conjonctives et fibres élastiques), elle est richement irriguée.

Lipophile

Qui a une affinité pour l'huile et les corps gras. Une substance ou un groupement lipophile est le plus souvent hydrophobe.

Liposome

Petite sphère formée d'une bicouche ou de multicouches de phospholipides ; cette structure peut fusionner avec la paroi cellulaire et délivrer son contenu à l'intérieur de la cellule. On peut en faire varier la composition à l'infini en vue d'applications diverses, notamment médicales (par exemple liposomes plus ou moins modifiés pour le transport ciblé dans l'organisme de molécules anticancéreuses).

Liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA)

Fluide obtenu par le lavage du compartiment alvéolaire du poumon avec une petite quantité d'une solution physiologique stérile.

Macrophages

Cellules du système immunitaire qui ont pour fonction de phagocyter (absorber en vue de détruire ou neutraliser) les corps étrangers. Ils sont présents dans la quasi-totalité des

tissus, notamment le foie (cellules de Küpffer), le système nerveux central (microglie), le poumon (macrophages alvéolaires), les follicules lymphoïdes (macrophages à corps tingibles)... Ce sont des monocytes qui se sont transformés après avoir été activés. En cas d'agression excédant leurs défenses, ils secrètent des substances chimiotactiques, dont certaines induisent l'arrivée de polymorphonucléaires (PMN), seconde ligne de défense aspécifique du système immunitaire.

Média filtrant

Ce qui constitue la nature (par exemple verre) et définit la structure (par exemple fibres) d'un filtre.

Métablasie

Différenciation cellulaire qui confère des caractéristiques différentes de la cellule d'origine.

Métablasie squameuse : l'épithélium normal est transformé en un épithélium de type squameux stratifié.

Métablasie broncho-alvéolaire : l'épithélium alvéolaire montre des cellules normalement trouvées dans les bronchioles, par exemple cellules de Clara ou cellules ciliées.

Morbidité

Taux de maladies ou symptômes observés dans une population donnée, soit pendant un temps donné, en général une année (incidence, correspondant à de nouveaux cas), soit à un moment donné (prévalence, correspondant à la proportion de cas).

Mortalité

Taux de décès dans une population donnée.

Nanoaérosol

Aérosol composé de nanoparticules et de particules nanostructurées.

Nanoparticule

Particule isolée dont le diamètre nominal (qu'il soit géométrique, aérodynamique de mobilité, de surface projetée ou autre) est inférieur à environ 100 nm.

Néoplasme

C'est une tumeur solide. Le néoplasme est :

- bénin : croissance tissulaire, parfois volumineuse, localisée au site d'origine. Les tumeurs bénignes sont souvent désignées par le suffixe -ome ajouté au nom du type de cellule dont elles sont dérivées (chondrome, issu du cartilage ; fibrome, d'un tissu fibreux ; papillome, d'un tissu épithélial ; adénome, épithélial, à structure glandulaire ou non) ;
- ou malin (cancer). Tumeurs malignes issues du mésenchyme (sarcomes, comme fibrosarcome, chondrosarcome...), de tissus épithéliaux (carcinomes, comme adénocarcinomes, carcinome épidermoïde...).

Ne pas confondre tumorigène (la tumeur peut être bénigne) et carcinogène (la tumeur est maligne).

Particule

Petite masse discrète d'un corps solide ou liquide.

Particule nanostructurée

Particule dont les caractéristiques structurales, inférieures à 100 nm, peuvent influencer les propriétés physiques, chimiques et/ou biologiques. Sa dimension peut dépasser 100 nm : par exemple, un agglomérat de nanoparticules d'un diamètre global de 500 nm peut être considéré comme une particule nanostructurée.

Particule primaire

Particule qui ne résulte pas d'un regroupement de particules plus petites. Ce terme désigne par exemple les particules formées par nucléation de la phase vapeur avant coagulation.

Particule ultra-fine

Particule dont le diamètre nominal (qu'il soit géométrique, aérodynamique de mobilité, de surface projetée ou autre) est inférieur à environ 100 nm. Ce terme est souvent utilisé dans le cas de particules produites par un processus (particules secondaires), par exemple fumées de soudage ou de combustion.

Percentile

Le percentile p est la valeur de la variable en deçà de laquelle se trouvent p % des données. Par exemple, un 90^e percentile égal à 5 mg/m³ signifie que 90 % des valeurs observées sont inférieures à 5 mg/m³. Le 50^e percentile correspond à la médiane.

Perméance

Fraction P d'aérosol (en pourcentage en masse ou en nombre) qui traverse un filtre (complément à l'efficacité : $P = 100 - E$).

Perte de charge

Différence de pression statique (en millimètres de colonne d'eau ou en Pascals) entre amont et aval d'un filtre. Elle est de l'ordre de 50 à 100 Pa au débit nominal pour un filtre à moyenne efficacité, de 150 à 250 Pa pour un filtre à très haute efficacité.

Phagocytose

Mécanisme par lequel certaines cellules (macrophages, granulocytes) ou organismes unicellulaires (protistes) ingèrent des particules étrangères (bactéries, débris cellulaires, particules...). C'est un moyen de défense de l'organisme, par exemple lors d'infections. La **phagocytose** est notamment assurée par deux types de cellules appartenant à la famille des leucocytes, les polynucléaires neutrophiles et les monocytes macrophages. Les neutrophiles, premiers à se rendre sur le lieu de l'inflammation, sont rejoints dans

les heures qui suivent par les monocytes. Ces derniers subissent une différenciation en macrophages, qui vont persister généralement plus longtemps que les neutrophiles.

Phosphatase alcaline

Enzyme, ainsi nommé car il agit à des pH de l'ordre de 8 à 10, qui hydrolyse les phosphomonoesters en libérant du phosphate. Son activité nécessite la présence d'ions Zn^{++} . La phosphatase alcaline sérique est constituée de quatre types différents ; elle augmente dans toutes les formes de cholestase, dans les maladies osseuses, ainsi qu'en cas de fractures et de tumeurs malignes.

C'est un indicateur d'atteinte des cellules épithéliales de type II.

PM₁₀, PM_{2,5}, PM_{0,1}

Les particules de diamètre inférieur à environ 40 μm restent plus ou moins longtemps « en suspension » dans l'air ambiant. Parmi elles, on distingue couramment les PM₁₀, ensemble des particules de diamètre inférieur à 10 μm , et PM_{2,5} l'ensemble des particules de diamètre inférieur à 2,5 μm , ces fractions incluant les particules ultra-fines, de diamètre inférieur à 0,1 μm (PM_{0,1}). La fraction de diamètres de 2,5 à 10 μm est dite grossière, PM_{2,5} est dite fine, et PM_{0,1} ultra-fine.

Polynucléaires (ou granulocytes)

Globules blancs dont le noyau est polylobé, subdivisés en neutrophiles (les plus abondants), basophiles, éosinophiles, selon leur affinité pour certains colorants. Ils ont une intense activité de phagocytose.

Protéines totales du LLBA

La mort cellulaire ou la perte des contacts intercellulaires provoque la libération de protéines dans le LLBA. En plus de dosages spécifiques (par exemple albumine), le dosage des protéines totales du LLBA est une indication d'effets anormaux ou pathologiques au niveau des voies respiratoires (augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire).

Radicaux libres

Molécule ou partie de molécule portant un électron non apparié, usuellement instable et réagissant rapidement avec les molécules environnantes. Les radicaux libres dérivés de l'oxygène se forment dans de nombreuses réactions comportant des transferts d'électrons (voir espèces activées de l'oxygène).

RPE (anglais : EPR)

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique de spectroscopie hertzienne (9-10 GHz) qui permet une détection directe des radicaux libres. L'électron a un mouvement de rotation sur lui-même (le spin), caractérisé par un nombre quantique dont les valeurs $\pm 1/2$ correspondent aux deux orientations qu'il peut prendre dans un champ magnétique, l'une parallèle, l'autre antiparallèle au champ. La RPE étudie les transitions entre ces orientations sous l'influence d'un champ magnétique intense.

Surface active

En aérosologie, surface d'une particule directement impliquée dans les interactions avec les molécules gazeuses environnantes. Elle varie en fonction du carré du diamètre de la particule lorsque les particules sont plus petites que le libre parcours moyen du gaz porteur ; elle est proportionnelle au diamètre des particules lorsque celles-ci sont nettement plus grandes que le libre parcours moyen du gaz porteur.

Surface spécifique

Surface d'une particule ou d'un matériau rapportée à sa masse (m^2/g , par exemple).

Systémique (effet-)

Un effet systémique résulte de la distribution d'un toxique à un site autre que celui de son entrée dans l'organisme, où des effets peuvent également survenir. On parle dans ce sens de distribution systémique, ou encore de toxicité systémique.

Thrombose

Caractérisée par la formation d'un caillot, appelé thrombus, dans l'appareil circulatoire. On distingue deux sortes de caillots : le thrombus rouge, formé d'un réseau de fibrine englobant des globules rouges ; le thrombus blanc, formé de plaquettes sanguines agglutinées. Les plus fréquents combinent les deux types précédents ; ils peuvent être volumineux mais n'interrompent pas toujours la circulation.

TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha)

Une des cytokines (glycoprotéine, 17 kDa) produites le plus tôt et le plus abondamment par diverses cellules (notamment macrophages, monocytes, neutrophiles) en réponse à différents stimuli. Accompagne ou provoque des réponses pathologiques (infiltration de cellules inflammatoires, prolifération cellulaire, hyperlipidémie, fibrose, cholestase, etc.). Contribue à l'appel des leucocytes pulmonaires (réponse inflammatoire), stimule la sécrétion d'autres cytokines (chimiokines), influence l'accumulation de collagène. Elle a une activité de nécrose contre les cellules de lignées tumorales (d'où son appellation) et augmente la capacité de rejet des greffes de tumeur.

Translocation

D'une façon générale, la translocation désigne un changement d'emplacement (du latin *trans* – au-delà, à travers – et *locus* – lieu, place, emplacement). Ce terme est souvent utilisé en génétique pour désigner le passage de certains gènes d'un chromosome à l'autre. Translocation pleurale : transfert (de particules, fibres, par exemple depuis le poumon) vers la plèvre.

Les mécanismes physiques de la translocation sont : le transport mucociliaire, la phagocytose par un macrophage, la translocation interstitielle, le drainage lymphatique, la circulation sanguine, et le transport neuronal. Il peut aussi y avoir une translocation par mécanisme chimique (dissolution, lixiviation, lien à une protéine).

Transport actif

Passage d'une molécule au travers d'une membrane, du côté où elle est moins concentrée vers le côté où elle est plus concentrée, grâce à un transporteur spécifique. Ce mécanisme de transport nécessite de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP.

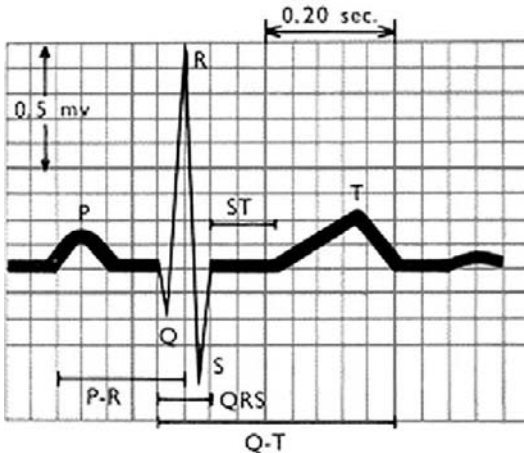
Transport mucociliaire

Le système de transport mucociliaire se compose d'une couche de cellules épithéliales ciliées et d'une couche aqueuse surmontée d'une couche de gel. S'étendant du nasopharynx aux bronchioles, il capture les particules inhalées déposées et les fait remonter le long des voies respiratoires jusqu'au pharynx, où elles sont dégluties.

Les cils des cellules épithéliales ciliées émergent de la couche aqueuse lors d'un mouvement vers le haut et entraînent le mucus ; ils se recourbent en arrière dans le fluide en libérant la couche de gel (mucus).

Variabilité de la fréquence cardiaque

La fréquence cardiaque de repos (de l'ordre de 70 battements par minute) doit s'accroître au cours d'un effort ou d'un stress pour assurer aux organes sollicités – en particulier au cœur lui-même – un débit sanguin suffisant. Ainsi la capacité du cœur à adapter sa fréquence de battement est l'un des indicateurs de son bon fonctionnement ; à l'inverse, une diminution de la variabilité du rythme cardiaque tend à montrer un problème. De nombreux indices sont utilisés pour quantifier cette variabilité.



Aspect d'un électrocardiogramme

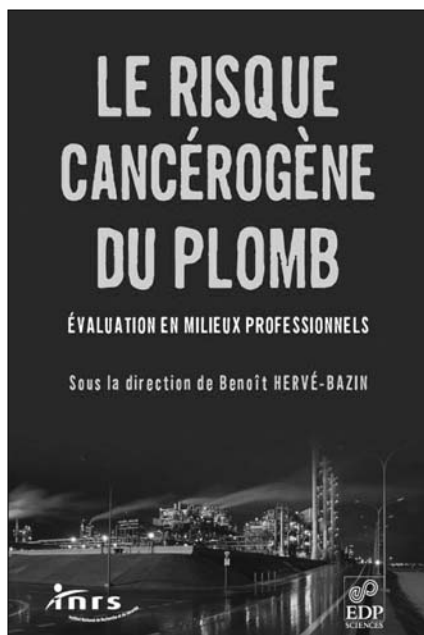
L'onde P correspond à la contraction de l'oreillette, les ondes QRS à la contraction des ventricules, et l'onde T à leur repolarisation.

Une manière très simple d'évaluer la variabilité du rythme cardiaque consiste à mesurer sur une plage de temps suffisante les espaces de temps séparant les ondes R successives.

VEMS (Volume expiratoire maximal en une seconde)

Volume gazeux expiré en une seconde après une inhalation maximale. Définit la capacité du poumon à évacuer l'air ; si les bronches sont bouchées, ce chiffre est très bas (cas de la bronchite chronique par exemple). C'est un paramètre reproductible.

Dans la même collection



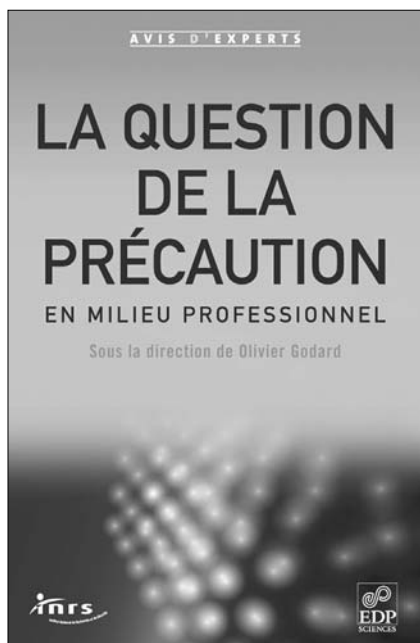
Le risque cancérogène du plomb Évaluation en milieux professionnels

Benoît Hervé-Bazin, coord.

« Le plomb, cancérogène ? » La réponse ne semble pas évidente, tant l'information, sur l'action de ce métal est contradictoire. De nombreuses études épidémiologiques ont pourtant mis en évidence l'action du plomb dans des cancers de l'estomac, du rein, du poumon touchant des populations exposées professionnellement au plomb ou à ses composés minéraux.

Édité en collaboration avec l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité), et sous la direction de Benoît Hervé-Bazin, cet ouvrage réalise le premier point jamais effectué sur le plomb et les risques que ce métal représente aux niveaux sanitaire, économique et sociétal.

• 2-86883-703-4 • 360 pages • 42 € • 2004



La question de la précaution En milieu professionnel

Olivier Godard, coord.

Depuis une trentaine d'années, le principe de la précaution sert de repère pour guider l'action face à des dangers qui ne sont pas complètement établis par les connaissances scientifiques disponibles. Cet ouvrage aborde de nombreux aspects de la question de précaution en milieu professionnel : historique, concepts, évolution... ainsi que des cas jugés exemplaires. Bien que ce principe soit sujet à polémique, il s'est néanmoins imposé de façon durable et se développe encore (sécurité alimentaire et santé publique).

Ce livre est le fruit d'un important groupe de travail animé par Olivier Godard, directeur de recherche au CNRS et professeur à l'École polytechnique.

• 2-86883-911-8 • 256 pages • 32 € • 2006