Nanoparticules et santé : des applications aux risques potentiels. L'exemple du TiO2

Marie-Anne Guitou

▶ **To cite this version:**

Marie-Anne Guitou. Nanoparticules et santé : des applications aux risques potentiels. L'exemple du TiO2. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01011269

HAL Id: dumas-01011269

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01011269

Submitted on 23 Jun 2014

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

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

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2014 Thèse N° 27

Thèse pour l'obtention du

DILPÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 9 avril 2014

Par **Marie-Anne GUITOU**

Née le 26 juillet 1988 à Bordeaux (Gironde)

NANOPARTICULES ET SANTÉ : DES APPLICATIONS AUX RISQUES POTENTIELS L'EXEMPLE DU TiO_2

Directeur de thèse

Monsieur Hervé SEZNEC

Jury

Madame Béatrice L'AZOU	Maître de Conférences	Président
Monsieur Hervé SEZNEC	Chargé de recherche, CNRS	Directeur
Madame Catherine HOURTIGUET	Docteur en pharmacie	Assesseur

Remerciements

Je remercie tout d'abord Monsieur Philippe Moretto, directeur du Centre d'Etudes Nucléaires Bordeaux Gradignan de m'avoir permis de réaliser cette thèse en partenariat avec le CENBG.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du jury pour le temps consacré à l'évaluation de ce manuscrit.

Madame Béatrice L'Azou, je vous remercie pour l'honneur que vous m'avez fait en présidant cette thèse. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mes remerciements et de mon profond respect.

Monsieur Hervé Seznec, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de diriger cette thèse. Votre disponibilité, ainsi que la qualité et la rigueur de votre enseignement m'ont permis de mener à bien ce travail. Veuillez trouver dans ce manuscrit, le témoignage de ma gratitude et de ma plus profonde considération.

Madame Catherine Hourtiguet, c'est un grand plaisir de vous voir siéger dans ce jury. Votre aide dans mes débuts professionnels ainsi que votre disponibilité m'ont été précieuses durant mes années d'études et plus particulièrement pendant mon stage de 6ème année au sein de la Pharmacie de Génicart.

Je tiens à élargir ces remerciements à l'ensemble de l'équipe de la Pharmacie de Génicart.

Je remercie également Quentin de m'avoir permis d'avancer ce travail grâce à ses explications d'expert.

A ma famille,

Je dédie cette thèse à mes parents. Je vous remercie pour votre grand soutien et vos conseils précieux. Vous m'avez aidée à me surpasser tout au long de mes études. J'espère que vous êtes fiers de mon parcours.

A Armelle, ma sœur, Matthieu, mon frère et Hugues, mon beau frère. Je suis fière de vous avoir à mes côtés. Merci pour votre soutien constant et si réconfortant.

A Vincent, tu m'as permis d'être plus sereine pendant toutes ces années d'étude.

A Elise et Inès, mes nièces. Vous êtes ma joie de vivre !

A Mamie Elise,

A Papi Albert et Mamie Simone.

A mes amis de Pharmacie, avec qui j'ai passé d'excellents moments, des soirées folles, de longues séances BU, des TP houleux : Anaïs, Vanessa, Colombe, Marc, Laura, Emilie, Chloé, Stéphanie, Julie, Hélène, Marlène… Merci à tous pour votre bonne humeur. Je vous souhaite de vous épanouir dans votre vie professionnelle et personnelle.

Sommaire

Liste des abréviations *9*

Liste des figures *11*

Liste des tableaux *13*

Préambule *14*

Partie 1 : Le nanomonde *17*

I. Définition du monde nanométrique **18**

II. Classification des nanoparticules **21**

1. Les nanoparticules « souples » 21

1.1. Nanoparticules d'inspiration biologique : les liposomes 21

1.2. Les polymères 22

2. Les nanoparticules « rigides » 22

2.1. Les principales nanoparticules à base de carbone 23

2.2. Les nanoparticules inorganiques rigides 24

III. Synthèse des nanoparticules **24**

1. Méthodes physiques 25

1.1. Evaporation/condensation 25

1.2. La pyrolyse laser 25
1.3. Méthode aérosol 26
2. Méthodes chimiques 26
2.1. Méthode sol-gel 26
2.2. Production de liposomes 27
2.3. Méthodes solvo-thermale et hydro-thermale 27
IV. Propriétés des nanoparticules 28
V. Modification de surface et/ou fonctionnalisation. Les applications au secteur biomédical 30
1. Amélioration de la stabilité en solution colloïdale. 30
2. Ciblage thérapeutique 31
3. Prévention de l'opsonisation 31
4. Modification de la charge de surface 32
5. Fonctionnalisation par un agent fluorescent pour l'imagerie. 32
6. « Passivation » d'agents de contraste nano-particulaires 33
VI. Caractérisation des nanoparticules 33
VII. Applications industrielles des nanoparticules 34
VIII. Réglementation 36
Partie 2 : Applications des nanoparticules en thérapeutique et cosmétique 40
I. Applications médicales 41
1. Système de délivrance de médicaments, principe de la vectorisation. 41

2. Imagerie médicale et oncologie 46

2.1. Applications à l'oncologie 46

2.1.1. Délivrance ciblée de molécules thérapeutiques à visée anticancéreuse. 46

2.1.2. Exploitation de caractéristiques propres aux nanoparticules 49

2.2. Applications à l'imagerie 51

3. Antiseptiques : l'exemple des nano-argents 54

II. Applications en dermo-cosmétique 55

1. Nanoparticules utilisées en cosmétique 56

2. Protection solaire 58

Partie 3 : Toxicologie et voies d'exposition aux nanoparticules 60

I. Toxicologie des nanoparticules 61

1. Les sources d'exposition de la population générale aux nanomatériaux 61

2. Principaux facteurs déterminant les effets toxicologiques des nanoparticules 62

II. Voies et conditions de pénétration 63

1. Pénétration cutanée 63

1.1. La peau : rappels anatomiques 63

1.2. L'épiderme 64

1.3. Fonction barrière de la peau 65

1.4. Limites de la « barrière cutanée » 66

1.5. Les voies de pénétration cutanée 67

2. Pénétration respiratoire 67

2.1. Rappel : Anatomie de l'appareil respiratoire 67

2.2. La muqueuse respiratoire 68

2.3. Fonction barrière de l'épithélium respiratoire 69

2.4. Limites de la « barrière respiratoire » 70

2.5. Pénétration et accumulation : déposition des nanoparticules dans les régions du système respiratoire 71

3. Ingestion 74

3.1. Rappel anatomique : l'appareil digestif 74

3.2. La muqueuse du tube digestif 75

3.3. Fonctions du tube digestif 76

3.4. Pénétration et accumulation des nanoparticules dans le tractus gastro-intestinal 77

III. Toxicocinétique des nanoparticules après pénétration dans l'organisme. 80

Partie 4 : Etudes in vitro et in vivo de la pénétration cutanée et des effets sur la santé des nanoparticules de TiO_2 contenues dans les dermo-cosmétiques. 84

I. Données concernant l'exposition de la population générale aux cosmétiques contenant des nanoparticules. 85

II. Mise en évidence du passage des nanoparticules contenues dans les dermo-cosmétiques au travers de la barrière cutanée et localisation cellulaire. 87

III. Facteurs influençant la pénétration des nanoparticules par voie cutanée. 93

IV. Effets toxiques potentiels des nanoparticules manufacturées utilisées en dermo-cosmétique : l'exemple du TiO_2 95

1. Les pathologies de la peau 95

1.1. La dermatite atopique 95

1.2. Cancers cutanés 96

2. Etat des connaissances sur la toxicité des nanoparticules de TiO_2 contenues dans les dermo-cosmétiques 100

2.1. Stress oxydatif 100

2.2. Inflammation 104

2.3. Perturbation de l'homéostasie ionique cellulaire 107

2.4. Effets carcinogènes 109

Conclusion et perspectives 112

Annexes 117

Références bibliographiques 124

SERMENT DE GALIEN 137

Liste des abréviations

Å : 1 Angstrom=10^{-10}m

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AFSSET : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

AIF : Apoptosis inducting factor

Ag : Argent

Al : Aluminium

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament

ARN : Acide ribonucléique

atm : Atmosphère

BALT : Tissu lymphoïde associé aux bronches

CdS : Sulfure de cadmium

CO_2 : Dioxyde de carbone

Cu : Cuivre

ERO : Espèces réactives oxygénées

Fe : Fer

IL : Interleukine

Ineris : Institut national de l'environnement industriel et des risques

INF : Interféron

INRS : Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles

InVs : Institut de veille sanitaire

IRM : Imagerie par résonnance magnétique

IRSST : Institut de recherche en santé et sécurité du travail

m : Mètre

MALT : Tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MET : Microscopie électronique à transmission

nm : Nanomètre

µm : Micromètre=10^{-6}m

OGM : Organisme génétiquement modifié

PEG : Polyéthylène glycol

Pd : Palladium

PIXE : Particle Induced X-Ray Emission

RBS : Rutherford Backscattering Spectrometry

Rh : Rhodium

SiO_2 : Dioxyde de silice

STIM : Scanning Transmission Ion Microscopy

TiO_2 : Dioxyde de titane

TNF : Tumor necrosis factor

UV : Ultra-violet

Zn : Zinc

ZnO : Oxyde de zinc

Liste des figures

Figure 1: Comparaison relative de nanomatériaux avec des structures biologiques (4).....19

Figure 2 : Représentation schématique d'un fullerène et des 60 atomes de carbone (noir) qui le compose. Les ronds noirs symbolisent les atomes de carbone, les traits bleus représentent les liaisons covalentes. Extrait du rapport R646 de l'IRSST. (9).....23

Figure 3 : Répartition en pourcentage de l'impact économique global des nanotechnologies en 2010 (2).....35

Figure 4 : Représentation d'un *liposome*, vésicule constituée d'un cœur aqueux entouré d'une couronne lipidique (25).....42

Figure 5 : Représentation d'une *micelle*, structure polymère de forme sphérique dont le cœur est hydrophobe et la couronne hydrophile (29).....44

Figure 6 : Représentation de *dendrimère*, macromolécule ramifiée tridimensionnelle qui peut accueillir et fixer une molécule de médicament (29).....45

Figure 7 : Représentation d'une *nanoparticule d'or*, transportant une molécule thérapeutique. Du PEG et un ligand y sont greffés (29).....49

Figure 8 : Représentation du marché des nanoparticules dans l'industrie cosmétique (47).....55

Figure 9 : Représentation anatomique de la peau et de ses annexes.....64

Figure 10 : Prédiction du dépôt de particules inhalées au niveau du système respiratoire chez l'homme en fonction du diamètre des particules. Le sujet respirant majoritairement par la bouche (pointillé) ou par le nez (ligne continue) (11).....73

Figure 11 *extraite* (4) *: Passage des nanoparticules à travers l'épithélium intestinal.* Trois voies sont suspectées : voie lymphatique, la plus documentée (absorption par les cellules M), la voie

paracellulaire (passage entre deux cellules), et la voie transcellulaire (absorption par les entérocytes, spécialisés dans l'absorption de nutriments) (63). 79
Figure 12 : Cinétique des nanoparticules. Le processus ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) est représenté. Les flèches pleines représentent les hypothèses confirmées concernant les voies empruntées par les nanoparticules ; les flèches pointillées les voies non démontrées (20)..... 81
Figure 13 : Coupe histologique montrant la pénétration d'une particule marquée par fluorescence à l'intérieur du follicule pileux. Image de microscopie électronique (76)..... 92
Figure 14 : Images obtenues par microscopie électronique à transmission des kératinocytes après traitement par TiO_2. (A) : détection d'agglomérats de TiO_2 dans l'espace extracellulaire dans une vésicule d'endocytose (e) et intracellulaire (i). (B) représente l'invagination de la membrane cellulaire précédent l'étape d'endocytose (86). 102
Figure 15 : Mécanisme décrivant les réponses intracellulaires aux radicaux oxygénés et azotés induits par des nitrites en présence de dioxyde de titane sous UVA (89). 104
Figure 16 : Evolution de la taille des tumeurs après injection intrapéritonéale de TiO_2 (97) 110
Figure 17 : Analyse PIXE-Tomographie (3D) de *C. elegans*. Distribution tissulaire des éléments chimiques (Phosphore, Soufre, Calcium). Détection et localisation des nanoparticules de TiO_2 (images CENBG) 116

Liste des tableaux

Tableau 1 : Domaines d’application en fonction du type de nanoparticules 36

Tableau 2 : Quelques pigments minéraux référencés dans le *Colour index* 58

Tableau 3 : Quantité moyenne et médiane de produit appliqué pour chaque type de cosmétiques par application, par jour ainsi que le nombre moyen d’applications par jour. 87

Préambule

Les nanotechnologies constituent un champ de recherche et de développement important depuis le début du XXI^{ème} siècle. Les nanotechnologies reposent sur la capacité à manipuler la matière à l'échelle la plus petite possible, de l'ordre du milliardième de mètre soit 10^{-9} m. L'utilisation des nanoparticules à l'échelle mondiale est considérable et ne cesse de s'accroître notamment sur le plan médical, environnemental et industriel.

Nombreuses sont les nations qui reconnaissent la nécessité de prendre en compte les nanoparticules dans la réglementation du fait de l'impact économique et sociétal qui en découle. En raison de leur taille, de leur persistance présumée dans l'environnement et des interrogations grandissantes concernant les effets potentiels sur la santé des utilisateurs, de nombreuses inquiétudes ont émergé. Suite au décret européen (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006, la France impose aux industriels depuis le 1er janvier 2013 de déclarer à l'Agence nationale de sécurité sanitaire la présence de matériaux à l'état nano-particulaire dans leur production. Cette mesure permet d'assurer la traçabilité, l'information au public et un recensement des produits mis sur le marché.

L'utilisation des nanoparticules rend possible la création de nouvelles classes de matériaux aux propriétés innovantes. De très nombreux travaux ont été publiés à ce sujet cette dernière décennie et les nanoparticules suscitent toujours beaucoup d'intérêt dans les domaines économique, industriel et médical.

A ce jour, les nanoparticules font partie de notre quotidien. De nombreuses applications industrielles et médicales sont en cours de développement, et sont pour certaines, déjà mises en œuvre. Les

nanoparticules produites intentionnellement sont actuellement utilisées dans les produits cosmétiques, d'hygiène (dentifrice), additifs alimentaires, articles de sport, pneus, vêtements, et autres produits de consommation courante. La quantité de nanoparticules synthétisées varie de quelques grammes par an (marqueurs dans l'imagerie biologique) à plusieurs tonnes (noir de carbone utilisé dans la fabrication de pneus de voiture) (1).

Entre 2010 et 2015, les enjeux économiques liés à l'avènement des nanotechnologies au niveau mondial devrait atteindre 1000 milliards d'euros par an tous secteurs confondus et concerner l'emploi de plus de deux millions de personnes (2).

Il est alors possible de s'interroger sur les progrès apportés par ces nanoparticules par rapport aux technologies déjà existantes et de l'intérêt de l'utilisation massive des nanoparticules ces dernières années. Des études montrent que certaines propriétés des objets à l'échelle nanométrique peuvent conférer des comportements spécifiques, exacerbant, dans certains cas, leur réactivité chimique, leur comportement électronique ou magnétique, ou encore, leur potentiel de pénétration dans les organismes vivants.

L'essor des nanoparticules dans les produits de notre quotidien nécessite d'en évaluer les effets sur l'homme et son environnement. A ce jour, les données disponibles concernant l'impact de ces nanoparticules sont nombreuses mais demeurent complexes et incomplètes. Déterminer l'impact des nanoparticules s'avère particulièrement difficile : multiplicité de celles-ci, propriétés physicochimiques variées, nombre restreint d'études *in vivo*, multiples voies d'exposition et difficulté de quantifier les doses présentes dans l'organisme. De plus, les résultats des études toxicologiques ne permettent pas d'établir à l'heure actuelle un bilan clair de leur toxicité potentielle.

Cette thèse d'exercice a pour but de proposer un état des lieux des connaissances actuelles, des applications et progrès apportés par l'utilisation des nanoparticules notamment dans le domaine de l'imagerie médicale, de l'oncologie et de la dermo-cosmétique. Premièrement, nous nous intéresserons aux différents modes de synthèse des nanoparticules, à leurs propriétés, ainsi qu'à la réglementation actuellement en vigueur. Dans un deuxième temps, il sera question de comprendre les interactions entre les nanoparticules et les molécules biologiques par l'étude des différentes voies d'exposition et de pénétration des nanoparticules. Enfin, à travers l'exemple de la nanoparticule de dioxyde de titane (TiO_2), nous recenserons les données actuelles concernant une potentielle toxicité des nanoparticules suite à l'application cutanée de dermo-cosmétiques et autres produits de soins.

Partie 1 : Le nanomonde

I. Définition du monde nanométrique

Le préfixe « nano » désigne un milliardième d'unité. Un nanomètre (nm) est donc un milliardième de mètre.

Les nanosciences concernent l'étude des phénomènes et la manipulation de matériaux à l'échelle atomique, moléculaire et macromoléculaire et dont les propriétés diffèrent significativement de celles observées à plus grande échelle.

Les nanotechnologies concernent la conception, la caractérisation, la production et la mise en œuvre de structures, de dispositifs et de systèmes par le contrôle de leur forme et de leurs dimensions à l'échelle du nanomètre.

Les nanomatériaux quant à eux, sont définis comme étant des matériaux sous forme de poudre, d'aérosol, de suspension liquide ou de gel, possédant une ou plusieurs dimensions à l'échelle nanométrique, c'est- à-dire de l'ordre du milliardième de mètre ou 10^{-9} m.

Certaines nanoparticules sont d'origine naturelle c'est à dire issues d'éruptions volcaniques, de feux de forêt, de l'érosion (3).

D'autres sont d'origine anthropogéniques proviennent de la fabrication de produits chimiques, du raffinage et de la fusion de minerais, de la combustion de matériaux fossiles par les véhicules et les moteurs d'avion (kérosène, diesel) ou de la production énergétique (charbon, mazout) (3).

La *figure 1* permet de positionner les nanoparticules à l'échelle du monde macroscopique (4).

Figure 1: Comparaison relative de nanomatériaux avec des structures biologiques (4)

Les nanomatériaux sont des assemblages d'atomes dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm (1). La limite inférieure admise est de 1 nm afin de ne pas désigner comme nanomatériaux des atomes ou molécules seuls ou en petit groupe. La limite supérieure admise est de 100 nm. C'est en général l'ordre de grandeur maximal pour lequel les propriétés physicochimiques des nanomatériaux s'expriment (1,5).

Il existe deux classifications possibles pour les nanoparticules.

Une classification des structures proposée en 2007 par Buzea *et al*., repose sur un classement en fonction des dimensions des nanoparticules en trois classes.

Classe 1 : Cette classe comprend les films minces et revêtements de surface inférieurs à 100 nm.

Classe 2 : Les revêtements épais et filtres nanoporeux.

Classe 3 : Les nanoparticules sous forme compacte de structure polyédrique ou sphéroïde. Cette structure peut être simple, telle la nanoparticule libre, ou plus complexe, et former des agrégats ou agglomérats de nanoparticules. Les nanoparticules ont généralement une structure cristalline et sont souvent de forme sphérique.

Une autre classification en fonction des dimensions est aussi admise (2). Dans ce cas, les nanomatériaux sont répertoriés et classés en quatre familles selon leurs formes d'utilisation.

Nanomatériaux de dimension 0 : Les nanomatériaux sous forme dispersée, aléatoire ou organisée (nanopoudres, fullerènes et nanocapsules).

Nanomatériaux de dimension 1 : Les nanomatériaux sous forme de nano-fils et nanotubes.

Nanomatériaux de dimension 2 : Les revêtements de surface épais et les couches minces.

Nanomatériaux de dimension 3 : Les nanocomposites. Les nanocomposites sont essentiellement constitués de deux phases : le renfort et la matrice. Un nanocomposite comprend généralement un

renfort nanométrique avec des propriétés différentes du matériau massif. Les nanomatériaux possèdent des propriétés spécifiques de surface qui induisent des interactions plus fortes avec la matrice. L'incorporation de nanomatériaux dans les composites permet d'apporter de nouvelles fonctionnalités ou de modifier leurs propriétés mécaniques, optiques, magnétiques ou thermiques.

D'un point de vue chimique, il existe deux grandes catégories de nanoparticules qui diffèrent par leur composition : *les nanoparticules organiques* à base d'atomes de carbone, telles le noir de carbone, les nanoparticules de polymères ou les nanomicelles et *les nanoparticules inorganiques* de composition métallique (Zn, Fe, Cu) comme les oxydes métalliques (TiO_2, ZnO, SiO_2) (6).

II. Classification des nanoparticules

Dans ce manuscrit, seront brièvement décrites les nanoparticules les plus couramment utilisées et synthétisées relevant d'un intérêt pour le domaine médical et dermo-cosmétique.

Il est possible de les classer en deux catégories selon leurs caractéristiques physiques : « souples » ou « rigides » (6).

1. Les nanoparticules « souples »

1.1. Nanoparticules d'inspiration biologique : les liposomes

Ce sont typiquement des particules souples déformables s'inspirant de l'organisation des membranes cellulaires. Il s'agit d'une structure vésiculaire constituée d'une bicouche phospholipidique concentrique et d'un cœur aqueux. On parle de molécule amphiphile. Ce caractère est dû à la présence d'un pôle hydrophile s'orientant vers les éléments aqueux et d'un pôle hydrophobe s'orientant vers les constituants organiques (7).

Pour exemple, les liposomes se révèlent intéressants dans l'élaboration de topiques dermatologiques car les drogues incorporées dans cette structure pénétreraient plus facilement dans le canal du

follicule pileux que les molécules d'un autre type de formulation en raison de leur similitude moléculaire avec les lipides cutanés.

1.2.Les polymères

De nombreux polymères organiques sont produits dans des dimensions nanométriques. Pour exemples, citons le chlorure de polyvinyle, le polystyrène ou encore le latex. Réduits à l'échelle nanométrique, ces composés peuvent être, dans certaines conditions, solubilisés ou modifiés chimiquement. Plusieurs de ces polymères organiques sont à même d'être préparés sous forme de nano-fils.

2. Les nanoparticules « rigides »

Parmi les classifications, celle de l'Institut de recherche en santé et sécurité du travail canadien implanté au Québec (IRSST), définit et établit une classification des nanoparticules rigides dans son rapport R646. Ce rapport résume les connaissances actuelles sur les nanoparticules de synthèse.

Les nanoparticules rigides sont des structures colloïdales de différentes formes et différentes tailles, constituées de carbone ou d'éléments tels que des métaux (or, argent…), des oxydes métalliques (oxydes de fer…), des céramiques (silice).

2.1.Les principales nanoparticules à base de carbone

Les fullerènes sont des cages constituées d'atomes de carbone. La forme la plus étudiée, synthétisée pour la première fois en 1985 (8), est sphérique et contient 60 atomes de carbone.

Cependant, il existe des structures contenant de 28 à 1500 atomes de carbone et pouvant atteindre 8,2 nm de diamètre.

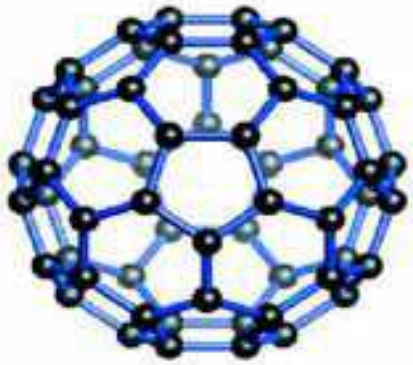

Figure 2 : Représentation schématique d'un fullerène et des 60 atomes de carbone (noir) qui le compose. Les ronds noirs symbolisent les atomes de carbone, les traits bleus représentent les liaisons covalentes. Extrait du rapport R646 de l'IRSST. (9)

Le graphite est composé d'une série de couches superposées d'un réseau hexagonal d'atomes de carbone, dont chaque atome est lié à trois carbones voisins dans un réseau planaire. Séparer ces couches en une monocouche, dont l'épaisseur est de l'ordre du nanomètre, permet d'obtenir des feuillets de graphène.

Les nanotubes de carbone constituent une nouvelle forme cristalline du carbone. Ils se présentent sous forme de nano-feuillets de graphène. Ce sont des cylindres creux pouvant avoir des diamètres inférieurs au nanomètre et atteindre plusieurs millimètres de longueur. Chaque extrémité peut être ouverte ou fermée par une demi-molécule de fullerène.

Le noir de carbone est constitué de matériel graphitique partiellement amorphe, c'est-à-dire non cristallisé, dont une fraction des particules élémentaires est de dimension nanométrique, généralement de 20 à 70 nm. Ces particules, majoritairement sphériques peuvent s'agglomérer et former des structures pouvant atteindre 500 nm.

Les nano-fibres de carbone sont constituées de feuillets de graphène. Contrairement aux nanotubes, elles ne s'enroulent pas en cylindre régulier mais s'organisent plutôt en structure en forme de cône ou de « tasse » non fermé aux extrémités.

2.2.Les nanoparticules inorganiques rigides

Les métaux peuvent être élaborés dans des dimensions nanométriques.

Des oxydes métalliques de dimensions nanométriques existent également. Les plus courants, car produits à grande échelle, sont la silice (SiO_2), le dioxyde de titane (TiO_2) et l'oxyde de zinc (ZnO).

III. Synthèse des nanoparticules

Les voies de production de ces nanomatériaux sont extrêmement variées. Les nanoparticules sont synthétisées selon différentes approches : essentiellement par la méthode ascendante, (traduction littérale de l'anglais « *bottom-up* »), ou la méthode descendante (traduction littérale de l'anglais « *top-down* ») (2). Par l'approche ascendante ou *« bottom-up »*, les nanoparticules sont construites atome par atome ou molécule par molécule (hydrolyse ou condensation d'alkoxydes). Dans l'approche descendante ou *« top-down »*, une grande structure est graduellement sous-dimensionnée, jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques après application de sollicitations mécaniques sévères, de chocs violents et de fortes déformations (broyage). L'approche ascendante permettrait la production d'une plus grande diversité d'architectures et, souvent, un meilleur contrôle de l'état nanométrique (tailles et distribution granulométrique relativement mono disperse,

positionnement des molécules, homogénéité des produits). Par opposition, l'un des avantages de la méthode descendante serait une capacité de production plus volumineuse mais un contrôle de l'état nanométrique plus délicat.

Dans un rapport de 2006, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFFSET) classe les différents modes de synthèse des nanoparticules en fonction des procédés physiques, chimiques et mécaniques *(Annexe 1)*. Les procédés les plus courants sont brièvement décrits ci-après.

1. Méthodes physiques

1.1. Evaporation/condensation

Cette méthode consiste à évaporer un métal par chauffage puis à condenser la vapeur métallique afin d'obtenir des nanopoudres formées de particules nanométriques dispersées. La difficulté de cette technique est le contrôle absolu et homogène des particules à l'échelle nanométrique. Les nanoparticules sont obtenues par refroidissement très rapide de la vapeur métallique. Ce procédé permet de produire de très grandes quantités de particules.

1.2. La pyrolyse laser

La pyrolyse laser est une méthode simple et efficace de synthèse de poudres nanométriques. Elle repose sur l'interaction entre un laser CO_2 et un flux de réactifs. Le transfert d'énergie provoque une élévation rapide de température. Les réactifs « précurseurs » sont dissociés et une flamme apparaît dans laquelle se forment les nanoparticules, qui subissent ensuite une baisse rapide de température ou « effet de trempe » en sortie de flamme. Les poudres sont alors entraînées par un flux gazeux dans une zone de collecte. Dans la plupart des cas, cette collecte s'effectue sur poudre sèche.

Cette méthode possède de nombreux avantages : une grande pureté chimique des produits, une

bonne homogénéité physique et chimique, une vitesse de trempe rapide et une bonne souplesse d'utilisation.

1.3.Méthode aérosol

Un aérosol est un ensemble de particules, solides ou liquides, d'une substance chimique donnée en suspension dans un milieu gazeux. La synthèse de nanoparticules peut être obtenue par oxydation dans des flammes à très haute température ou plasma thermique à partir de précurseurs gazeux ou liquides amenés sous forme d'aérosol.

La formation d'un aérosol ne nécessite pas un grand volume de liquide. La durée de réaction est très courte et permet l'obtention de particules pures avec un débit et un rendement intéressants.
Ce procédé permet notamment la production de plusieurs tonnes par an de dioxyde de titane, silice ou noir de carbone.

2. Méthodes chimiques

2.1.Méthode sol-gel

Le procédé sol-gel permet de fabriquer un polymère inorganique par des réactions chimiques simples, à une température comprise entre 20 et 150°C. La synthèse est effectuée à partir d'alcoolates de formule $M(OR)_n$ où M est un métal ou le silicium et R un groupement organique alkyle C_nH_{2n+1}. Cette réaction s'effectue en deux temps. Premièrement, il y a hydrolyse du précurseur et départ d'un groupement alkyle. Cette étape peut être catalysée par la modification du pH dans le milieu réactionnel. La dispersion est appelée le « sol ». Dans un deuxième temps, il se produit une polymérisation inorganique qui aboutit à la formation du « gel ». Le « gel » est ensuite séché afin d'éliminer la phase aqueuse à l'aide d'un four par exemple.

L'intérêt de ce procédé est l'existence de précurseurs pour un grand nombre de métaux et non-

métaux. Ils sont soit liquides soit solides, et pour la plupart, solubles dans des solvants usuels aqueux ou organiques. Cette méthode permet un bon contrôle de la morphologie des nanoparticules obtenues et la production de matériaux de plus grande homogénéité et pureté à des températures inférieures à celles des méthodes conventionnelles. En revanche, un des inconvénients demeure le coût des précurseurs.

2.2.Production de liposomes

La façon la plus classique de préparer des liposomes est celle dite de l'hydratation d'un film lipidique. Ce film est souvent obtenu par évaporation d'un solvant organique dans lequel les lipides sont dissous. L'hydratation de ce film conduit alors à la séparation de fragments de bicouches lipidiques. L'utilisation de phospholipides naturels permet de créer des systèmes qui miment les membranes biologiques.

2.3.Méthodes solvo-thermale et hydro-thermale

La méthode solvo-thermale permet de produire un grand nombre de matériaux : métaux, céramiques, semi-conducteurs et polymères. Ce procédé consiste à employer un solvant sous haute pression (entre 1 atm et 10 000 atm) et à une température comprise entre 100 et 1000°C au sein d'un autoclave. Cependant, le principal inconvénient d'un tel dispositif fermé est l'inertie thermique du réacteur qui doit résister à l'effet conjugué de la température et de la pression, et aux variations de températures qui en résultent dans le milieu réactionnel. Ces limitations peuvent être supprimées en utilisant un dispositif en continu.

Un large choix de solvants possédant une température d'ébullition élevée peut être utilisé.

Cette méthode solvo-thermale garantit un meilleur contrôle de la taille, de la forme et une meilleure qualité de fabrication des cristaux. Lorsque le solvant utilisé est l'eau, on parle de méthode hydro-thermale. La température est alors moins élevée.

Les nanoparticules sont généralement très bien cristallisées et ne nécessitent aucun traitement

thermique supplémentaire après récupération.

IV. Propriétés des nanoparticules

Les nanoparticules présentent des propriétés qui sont fonction de leur composition, de leur structure cristalline, de la surface exposée ainsi que de leur procédé de synthèse. Cependant, quelle que soit leur origine, les nanoparticules possèdent des propriétés physiques communes qui découlent notamment de leur dimension. Lorsque la taille diminue, la surface spécifique augmente, le nombre d'atomes en surface devenant plus important. Cela a pour conséquence une modification des propriétés optiques, électriques, magnétiques, physiques (abaissement de la température de fusion), catalytiques (réactivité accrue) du matériau sous forme nano-particulaire par comparaison au même matériau à l'échelle microscopique (1,10).

Les propriétés des nanoparticules sont pour la plupart directement liées à leur petite taille ainsi qu'à leur surface.

Lorsque la taille diminue, le nombre de particules par gramme de matière croit considérablement. Ainsi, le nombre d'atomes localisés en surface, c'est-à-dire en contact avec le milieu environnant augmente.

De plus, la réactivité d'une nanoparticule dépend de sa surface. Le rapport surface/particules et surface/masse étant beaucoup plus important pour les nanoparticules que pour les particules microscopiques, leur réactivité augmente (1,11).

La taille nanométrique est également susceptible de modifier les propriétés électriques de certains matériaux semi-conducteurs présentant une activité photo-catalytique à l'instar du dioxyde de titane (TiO_2) (12). Le principe de la photo-catalyse est l'activation d'un semi-conducteur par absorption d'énergie lumineuse (photon). Au sein d'un semi-conducteur, le gap entre la bande de valence et de la bande de conduction est de faible énergie. L'absorption d'un photon d'énergie supérieure au gap

permet le transfert d'un électron de la bande de valence vers la bande de conduction formant un exciton. Un exciton est une combinaison d'un électron (chargé négativement) et d'un « trou » (chargé positivement), formé par le départ de l'électron. Ces deux entités sont instables et ont tendance à se recombiner avec une espèce environnante induisant la formation de radicaux libres susceptibles de réagir avec le milieu. En effet, les nanoparticules ont une surface plus importante favorisant la création de paire d'électrons ou excitons. La production d'exciton est à la base du processus de photo-catalyse. Parmi les photo-catalyseurs les plus utilisés, on recense les oxydes métalliques et plus particulièrement le TiO_2. Dans ce cas particulier, l'énergie apportée pour l'activation du catalyseur doit se faire sous forme de rayonnements UV. Ce procédé peut être exploité à des fins de traitements de l'eau ou de purification de l'air (13).

Les propriétés optiques des nanoparticules s'avèrent également très intéressantes. De par leurs dimensions inférieures aux longueurs d'onde de la lumière visible (380 – 780 nm), elles réduisent l'absorption et la diffusion de la lumière modifiant ainsi les propriétés optiques de certains matériaux. Sous forme de fine couche, elles apparaissent comme transparentes. Certaines nanoparticules comme les oxydes métalliques (ZnO, TiO_2) de diamètre compris entre 30 et 80 nm sont ainsi utilisées en tant que filtres solaires grâce à leur capacité d'absorption des rayonnements ultra-violets tout en restant transparentes à l'œil nu. Ces propriétés sont à l'origine de leurs nombreuses applications en dermo-cosmétique (12).

Parmi les propriétés des nanoparticules, notons aussi leur comportement dans un aérosol, c'est-à-dire en suspension dans un fluide (liquide ou gaz). Dans un fluide, le comportement dynamique des nanoparticules dépend essentiellement de la balance qui existe entre l'agitation brownienne, d'autant plus importante que la dimension est petite, et la sédimentation. Les particules de masse réduite ont tendance à persister dans le fluide de manière stable. Les particules de masse plus importante, quant à elles vont sédimenter sous l'action de la gravité.

Les nanoparticules stabilisées dans un fluide connaissent différents destins. Elles peuvent tout d'abord rester en suspension de manière stable ou bien se regrouper et sédimenter. Les processus de regroupement sont induits par des forces d'attraction faible (agglomération) ou forte (agrégation). Le regroupement des particules entraine une augmentation de la masse de celles-ci conduisant à leur sédimentation dans le fluide et donc à une diminution de leur concentration en suspension (11).

Enfin, les nanoparticules possèdent des propriétés mécaniques intéressantes qui peuvent se traduire par un phénomène de « superplasticité ». Elles permettent ainsi d'améliorer la résistance de matériaux composites sans compromettre leur ductilité, c'est-à-dire leur capacité à se déformer facilement (12).

V. Modification de surface et/ou fonctionnalisation. Les applications au secteur biomédical

Les nanotechnologies offrent la possibilité de modifier la taille, la charge de surface ainsi que les groupements fonctionnels de molécules à usage thérapeutique (14). Ces possibilités semblent illimitées (6). Les modifications de surface apportées aux nanoparticules dépendent de l'application potentielle envisagée.

1. Amélioration de la stabilité en solution colloïdale.

La fonctionnalisation des nanoparticules par des polymères augmente leur stabilité en solution colloïdale et leur biodisponibilité. De ce fait, il est possible de recouvrir la particule d'un produit chimique comme le polyéthylène glycol (PEG) afin d'augmenter la stabilité et le temps de présence de la molécule dans la circulation sanguine (6). C'est le cas par exemple du PEG-Intron® et du Pegasys®. Ce sont des interférons alfa, c'est-à-dire des protéines immunomodulatrices PEGylées, utilisées dans le traitement des infections chroniques au virus de l'hépatite C chez l'homme (15). Le polyéthylène glycol est un agent de fonctionnalisation intéressant car il est soluble, de taille

modulable, inerte et non toxique. La pégylation, c'est-à-dire l'ajout de PEG, permet ainsi d'accroître le temps de présence de la molécule dans la circulation et d'augmenter sa stabilité tout en diminuant l'immunogénicité des protéines recombinantes (16).

2. Ciblage thérapeutique

Les applications possibles de la fonctionnalisation des nanoparticules dans le domaine médical sont par conséquent très étendues. Pour exemples, des particules poreuses renfermant des molécules à usage thérapeutique permettent de livrer des médicaments de façon sélective à certains organes (17). Aussi, des nanoparticules se comportant comme système de délivrance d'antigène ou adjuvant (oxydes d'aluminium) servent à l'élaboration de vaccins. L'utilisation de nanoparticules permet non seulement d'augmenter la stabilité de l'antigène et son immunogénicité, mais également une délivrance ciblée au niveau des cellules immunitaires.

Les liposomes font partie des nanoparticules utilisées dans le développement des vaccins (encapsulation d'antigènes type enveloppe virale) (18).

La surface des nanoparticules peut également être utilisée comme plateforme de fixation de ligands. L'ajout d'anticorps monoclonaux ou spécifiques de cellules cancéreuses comme l'acide folique (vitamine B9) faciliteraient le ciblage des cellules cancéreuses au niveau du sein et du col de l'utérus (19) augmentant ainsi la capacité de ciblage thérapeutique (6).

Le ciblage thérapeutique permettant une délivrance optimale du médicament, limite ainsi le risque d'effet systémique et diminue la toxicité des agents thérapeutiques (en particulier des drogues anticancéreuses).

3. Prévention de l'opsonisation

La modification de surface des nanoparticules contribue également à prévenir leur opsonisation. L'opsonisation est un processus biochimique qui permet de recouvrir la molécule d'anticorps

spécifiques (opsonine) afin d'induire sa phagoctytose. Les opsonines sont donc des anticorps et certaines fractions du complément (groupe de protéines présentes dans le sérum sanguin) se liant aux antigènes de surface du corps étranger. La phagocytose quant à elle est l'ingestion suivie de la digestion d'une substance étrangère par les macrophages en vue de son élimination par l'organisme. La prévention de l'opsonisation par des agents stabilisants limite le risque de dégradation et d'agression par le système immunitaire (6).

4. Modification de la charge de surface

La modification de la charge de surface des nanoparticules influence leur pénétration cellulaire (20). Les applications médicales qui en découlent en dermatologie sont intéressantes. Ces procédés permettent un meilleur contrôle des processus suivants : pénétration, profondeur des nanoparticules au niveau du follicule pilo-sébacé, déplacement, cinétique ou type cellulaire ciblé. C'est ainsi que les liposomes cationiques pénètreraient plus profondément le follicule que le même liposome chargé négativement (6). Autre exemple, des nanoparticules de latex (50-500 nm) chargées négativement pénètrent dans l'épiderme alors que les particules chargées positivement ou neutre en sont incapables.

5. Fonctionnalisation par un agent fluorescent pour l'imagerie.

La fonctionnalisation des produits de contraste nano-particulaires par des agents fluorescents offre la possibilité d'une meilleure capacité de détection en imagerie médicale. Une large palette d'agents de contraste, de sondes fluorescentes et de radio-traceurs propose un éventail important d'opportunités pour l'imagerie du vivant et le développement d'approches diagnostiques. Pour exemple, les traceurs fluorescents infrarouges possèdent des propriétés photo-physiques adaptées à l'imagerie optique du vivant. Le vert d'indocyanine, notamment est utilisé pour visualiser les structures angiogéniques.

Plus récemment, les « quantum dots » ou « boites quantiques », sont de petits cristaux semi-

conducteurs qui présentent des propriétés électroniques associées à leur taille, et des propriétés photo-physiques d'intérêt majeur pour l'imagerie de fluorescence, avec une brillance et une stabilité photonique importantes (21).

6. « Passivation » d'agents de contraste nano-particulaires

« Passiver » un agent de contraste nano-particulaire, c'est l'empêcher de réagir en surface, tout en conservant ses propriétés optiques ou magnétiques. Concernant l'oxyde de fer, des travaux mettant en œuvre la "passivation" de la surface des nanoparticules par une couche de protéines (albumine) montrent une amélioration de la stabilité en solution et de la biocompatibilité des nanoparticules (22). Aussi, les nanoparticules inorganiques en dispersions colloïdales sont encapsulées dans une matrice polymérique par des techniques d'émulsions ou d'adsorption physique (23). L'objectif est d'obtenir des particules de structure et de morphologie bien définies en vu d'applications diagnostiques et thérapeutiques (hyperthermie magnétique, thérapie ciblée) (22,23). Le contrôle de la morphologie et des propriétés colloïdales reste aléatoire en raison de l'incompatibilité entre particules inorganiques (hydrophiles) et polymères (hydrophobes). Pour pallier ce problème, une étape de modification de surface de la nanoparticule inorganique (modification chimique, adsorption de surfactant) est nécessaire afin d'améliorer la dispersion dans la matrice organique (23).

VI. Caractérisation des nanoparticules

Une métrologie précise est indispensable à la compréhension des propriétés et des caractéristiques des nanomatériaux. Il est donc important de bien mesurer et de caractériser ces matériaux. Des travaux menés au niveau international portent sur la mise au point d'outils de mesure et de caractérisation des nanomatériaux (12). Au niveau européen, le programme NANOSAFE pour « SAFE production and use of NANOmaterials » a pour objectif de développer des outils de détection et de caractérisation chimique afin de promouvoir une meilleure gestion et évaluation des

risques dans le cadre d'une production industrielle sécurisée. Ce programme a l'intention de traiter en détail un nombre limité de nanoparticules de référence. Les institutions et organismes mettant au point des programmes de nanométrologie sont en expansion ces dernières années.

La métrologie implique la maîtrise du prélèvement, de la mesure des concentrations en nombre, en surface ou en masse ainsi que la détermination du spectre granulométrique. Les nanoparticules peuvent être collectées sur des filtres ou sur des plaques. Pour exemple, la microscopie électronique à transmission (MET) est classiquement utilisée pour définir la dimension et la forme des nanoparticules. La structure cristalline des nanoparticules, quant à elle, peut être caractérisée par la méthode de diffraction aux rayons X (DRX). Aussi, la surface spécifique doit être déterminée ainsi que la composition chimique des nanoparticules par des techniques d'analyse élémentaire. Enfin, l'étude du comportement des nanoparticules en solution se fera par zétamétrie (mesure de charges de surface). Pour cela, les appareils existants mis au point il y a déjà quelques décennies sont constamment améliorés (2).

VII. Applications industrielles des nanoparticules

Les avantages et applications que procurent les nanoparticules sur le plan médical, environnemental et commercial intéressent les professionnels de la santé, les industriels et les consommateurs. Les nanoparticules et nanomatériaux permettent d'accroître les performances de nombreux produits. D'après le rapport publié en 2008 par le Conseil des académies canadiennes (12), les performances particulièrement recherchées sont l'absorption des rayons ultra-violet, l'amélioration des qualités textiles, l'effet antimicrobien, l'apport d'une fonction autonettoyante ou antiadhésive de surface, l'augmentation de la dureté ou encore l'apport d'une fonction antiagglomérante ou fluidifiante.

De nombreux domaines d'activité utilisent déjà des nanoparticules pour améliorer leurs

applications. Entre autres, l'industrie automobile, l'industrie chimique, l'industrie électronique, la cosmétologie, la santé, la recherche, l'habitation, etc (9). (*Annexe 2)*. Particulièrement, le dioxyde de titane (TiO_2) est un excipient largement utilisé comme colorant ou antiagglomérant (E171) par l'industrie pharmaceutique dans l'élaboration des formes orales (gélules, comprimés).

Ainsi, de nombreux programmes de recherche et développement en matière de nanotechnologie ont un double objectif : améliorer les produits existants et donner naissance à des techniques inédites.

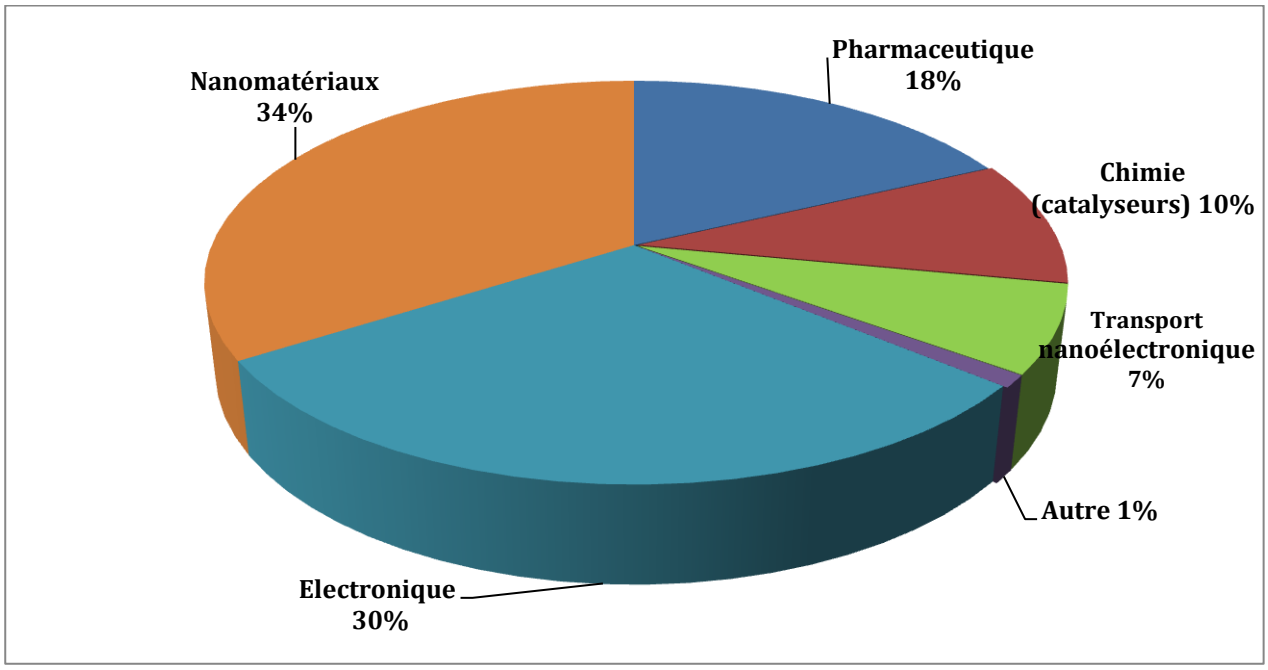

Figure 3 : Répartition en pourcentage de l'impact économique global des nanotechnologies en 2010 (2).

Types de nanoparticules	**Domaines d'application**
Fullerènes	Electronique, piles, cellules solaires, stockage des données et des gaz, additifs dans les plastiques
Graphènes	Télécommunication
Nanotubes de carbone	Applications potentielles en composites polymériques, émetteurs d'électrons, blindage électromagnétique, stockage de gaz
Nano-fibres	Additifs dans les polymères, support catalytique, stockage de gaz
Noir de carbone	Pigments, agents de remplacement des caoutchoucs (pneus)
Métaux	Marqueurs pour diagnostic médical, agent de traitement anticancéreux (Au), propriétés antimicrobiennes (Ag), convertisseurs catalytiques (Pt, Pd, Rh), combustible (Al)
Oxydes métalliques	Plastics et caoutchoucs (SiO_2), crème solaire (TiO_2, ZnO), pigments de peinture et cosmétiques (TiO_2)
Polymères organiques et dendrimères	Applications potentielles : biomédecine (régénération tissulaire et osseuse), Acheminement des médicaments, thérapies, agents de contraste
Liposomes	Applications médicales et pharmacologiques

Tableau 1 : Domaines d'application en fonction du type de nanoparticules

VIII. Réglementation

Les nanoparticules sont présentes dans de nombreux produits de consommation courante (crèmes solaires, textiles, aliments…) et dans des secteurs aussi variés que le bâtiment, l'automobile, la chimie, la santé etc. En raison des inquiétudes avancées par les agences de santé, du travail et les consommateurs, une réglementation spécifique au domaine des nanotechnologies doit être mise en place. L'objectif est de quantifier l'exposition des consommateurs et des travailleurs aux nanoparticules contenues dans les produits présents sur le marché afin d'évaluer les risques pour la

population.

Les antécédents largement médiatisés sur les OGM et le nucléaire ne font qu'amplifier ces inquiétudes et la nécessité d'une réglementation stricte.

Jusqu'à présent, seuls les Etats-Unis avaient mis au point une loi relative à la recherche et au développement des nanotechnologies (loi publique 108-153 votée en 2003). Toutefois, nombre de pays reconnaissent la nécessité de réglementer les nanotechnologies en raison des effets de leur taille, de la persistance dans l'environnement, de leur destruction et de la particularité des nano-objets produits par auto-assemblage. Les directives européennes et les textes français qui entourent la question du risque chimique se fondent sur l'évaluation de substances chimiques produites par des procédés « classiques ». Ainsi, cette approche est susceptible de ne pas correspondre au domaine récent des nanotechnologies.

La loi Grenelle 2 prévoyait le principe de la déclaration des nanoparticules. Deux décrets, parus le 19 février 2012 au *Journal officiel*, rendent cette obligation légale. Les articles L. 523-1 à L. 523-3 du code de l'environnement, créés par la loi Grenelle 2, prévoient l'obligation de déclarer l'identité, les quantités et les usages des substances à l'état nano-particulaire produites, distribuées ou importées en France.

"*Le dispositif a pour objet de mieux connaître ces substances et leurs usages, de disposer d'une traçabilité des filières d'utilisation, d'une meilleure connaissance du marché et des volumes commercialisés et enfin de collecter les informations disponibles sur les propriétés toxicologiques et éco-toxicologiques*", indique le ministère de l'Ecologie.

L'obligation concerne chaque fabricant, importateur et distributeur d'une substance à l'état nano-

particulaire "*en l'état ou contenue dans un mélange sans y être liée, ou de matériaux destinés à rejeter cette substance dans des conditions normales ou raisonnablement prévisibles d'utilisation*", dès lors qu'il produit, importe ou distribue au moins 100 grammes par an de cette substance.

L'article 3 du règlement CE n°1907/2006 définit une substance nano-particulaire comme une "*substance, fabriquée intentionnellement à l'échelle nanométrique, contenant des particules, non liées ou sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont une proportion minimale des particules, dans la distribution des tailles en nombre, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm*". Les fullerènes, les flocons de graphène et les nanotubes de carbone à paroi simple présentant des dimensions externes inférieures à 1 nm sont donc d'ores et déjà à considérer comme des substances à l'état nano-particulaire.

La déclaration devra être adressée au ministre chargé de l'environnement avant le 1er mai de chaque année, à compter de 2013. Se rapportant à l'année civile précédente, la première déclaration portera donc sur les données de 2012. Le défaut de déclaration peut donner lieu à une amende administrative pouvant atteindre 3.000 euros et une astreinte journalière de 300 euros.

Les déclarations, ainsi que les données qu'elles contiennent, seront gérées par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses).

Les informations relatives à l'identité et aux usages des substances déclarées doivent être mises à la disposition du public chaque année six mois après la date limite de déclaration. Cependant, le décret prévoit la possibilité pour les déclarants de demander à ce que les informations restent confidentielles lorsque leur diffusion pourrait porter atteinte au secret industriel et commercial.

Le deuxième décret précise les organismes auxquels l'Anses peut transmettre les informations qu'elle détient. Il s'agit de l'Ansm, de l'InVS, de l'INRS, de l'Ineris et des organismes chargés de la toxicovigilance.

Ce texte pourrait toutefois être révisé d'ici décembre 2014, en fonction du retour d'expérience et des nouvelles données scientifiques (9).

Partie 2 : Applications des nanoparticules en thérapeutique et cosmétique

I. Applications médicales

Le développement des nanotechnologies offre aujourd'hui des outils minuscules, dont les propriétés exceptionnelles permettent d'envisager des applications pointues en biomédecine (nano-médecine) : élaboration de traitements plus sûrs et possibilité de ciblage thérapeutique en font des applications prometteuses en cancérologie ou dermatologie par exemple.

D'autres travaux visent l'élaboration de surfaces biocompatibles pour implants et dispositifs orthopédiques, vaccins composés d'adjuvant à base de nanoparticules, production d'agents antimicrobiens, et pour l'imagerie médicale (imagerie par résonnance magnétique) par la mise au point de nanoparticules magnétiques comme agents de contraste.

1. Système de délivrance de médicaments, principe de la vectorisation.

De nombreux axes de recherche concernent les nanoparticules inorganiques appliquées au domaine médical. Il est possible de se poser la question de l'intérêt de développer des nano-médicaments en raison de la richesse de la pharmacopée déjà existante. Une nouvelle génération de médicaments s'appuyant sur les progrès des nanotechnologies tente de cibler uniquement les organes et les tissus malades. C'est le principe de la vectorisation (15). L'objectif est de permettre le transport de molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible (24). Pour cela, le vecteur doit répondre à de nombreuses exigences. Il doit être biocompatible, c'est à dire toléré par l'organisme, doit franchir les barrières biologiques et protéger la molécule jusqu'à son site d'action. De plus, il ne doit pas être toxique pour l'organisme. Ces performances permettent de limiter les effets indésirables et la toxicité des médicaments.

En piégeant la molécule dans une nanoparticule appelée « nanovecteur », le médicament est protégé des défenses naturelles du corps, il échappe au système immunitaire jusqu'au moment où il atteint

les tissus visés, les cellules malades, voire l'intérieur même de la cellule.

Dans ce manuscrit, seuls les principaux « nanovecteurs » seront brièvement décrits. Parmi ces « nanovecteurs » nous nous intéresserons plus particulièrement aux liposomes, micelles, nanocapsules, nanosphères, et dendrimères.

Les *liposomes* sont des vésicules microscopiques formées de bicouches phospholipidiques s'inspirant des membranes biologiques. Cette organisation spontanée est due au caractère amphiphile des phospholipides. La phosphatidylcholine est le phospholipide le plus couramment utilisé pour l'élaboration de liposomes incorporant des molécules thérapeutiques (25).

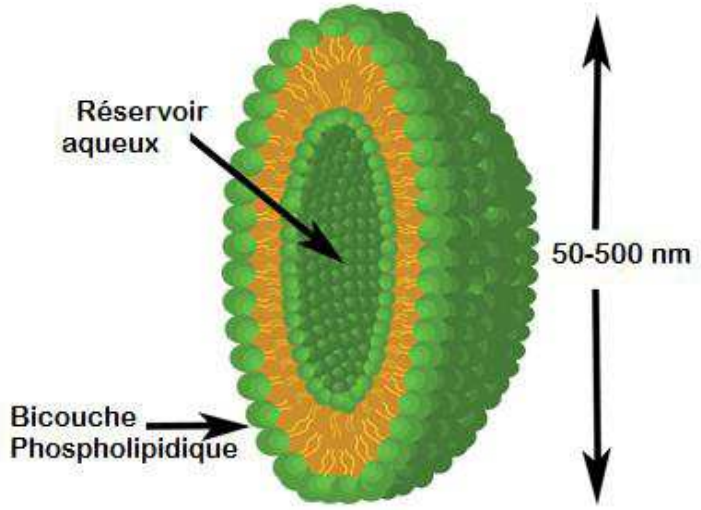

Figure 4 : Représentation d'un *liposome,* vésicule constituée d'un cœur aqueux entouré d'une couronne lipidique (25)**.**

Spontanément, les liposomes s'organisent en « *Multi-lamellar Vesicles* » (MLV) de 500 nm à 10 µm de diamètre et possèdent deux ou plusieurs bicouches lipidiques séparées entre elles par un milieu aqueux. On retrouve également des « *Small Uni-lamellar Vesicles* » (SUV), petits liposomes d'environ 25-50 nm de diamètre, possédant une seule bicouche de phospholipides. Enfin, les

« *Large Unilamellar Vesicles* » (LUV) sont composés d'une seule bicouche de taille comprise entre 50 et 500 nm de diamètre (25). Ces liposomes sont uniquement constitués du principe actif ou bien fonctionnalisés par du polyéthylène glycol (PEG) voire même par l'ajout de récepteurs aux marqueurs biologiques permettant un ciblage plus précis de la cellule malade en cancérologie par exemple.

Une dizaine de médicaments transportés par des « nanovecteurs » existent aujourd'hui sur le marché. C'est le cas par exemple de l'Ambisome®. Il s'agit d'une formulation liposomale d'amphotéricine B, antifongique polyénique à large spectre actif sur les mycoses systémiques. Cette formulation lipidique de l'antifongique a été mise au point pour augmenter la tolérance de la molécule tout en conservant son efficacité. En effet, l'amphotéricine B, traitement phare des mycoses invasives possède une néphrotoxicité importante (26).

Aussi, les liposomes suscitent l'espoir de thérapeutiques plus ciblées en dermatologie et plus particulièrement dans le traitement de pathologies telles que l'acné, la dermatite atopique, le psoriasis voire même les cancers cutanés.

La peau est un organe directement accessible par l'application de topiques dermatologiques. La délivrance optimale des molécules thérapeutiques nécessite la pénétration de la couche cornée afin d'atteindre le tissu cible tout en évitant un passage systémique susceptible d'être à l'origine d'effets indésirables. La structure moléculaire des liposomes étant proche des lipides cutanés, les molécules internalisées peuvent être libérées par fusion du liposome avec les membranes biologiques (6,25).

Les *micelles* se trouvent parmi les « nanovecteurs » développés avec des applications médicales potentielles.

Les micelles sont des nanoparticules constituées d'une couronne de molécules amphiphiles c'est-à-dire composées d'un pôle hydrophile et d'un pôle hydrophobe, en équilibre dynamique autour d'un cœur non solide (27). En solution aqueuse, les molécules amphiphiles s'organisent spontanément en minimisant les interactions de leurs parties hydrophobes avec l'environnement aqueux alors qu'en milieu organique les molécules amphiphiles adoptent le comportement inverse et ce sont les parties hydrophiles qui sont orientées au cœur de la micelle. Ces propriétés font des micelles, des nanoparticules intéressantes car, de préparation aisée, elles permettent d'incorporer des molécules aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes.

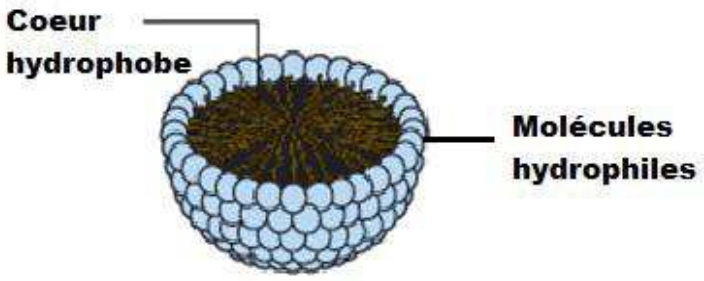

Figure 5 : Représentation d'une *micelle,* structure polymère de forme sphérique dont le cœur est hydrophobe et la couronne hydrophile (28)**.**

Des études soulignent une protection de l'opsonisation par l'organisation stérique particulière de la couronne des micelles. L'opsonisation est définie par l'attachement des molécules du complément à la surface de la micelle, permettant ainsi d'augmenter leur temps de demi-vie dans le sang (29). Cependant l'utilisation *in vivo* de ces micelles est encore à l'étape expérimentale.

Les « *nanocapsules* » sont des particules colloïdales constituées d'un réservoir liquide ou semi-liquide à température ambiante dans lequel les molécules sont généralement incorporées (30). Les molécules peuvent aussi être associées de façon covalente ou non à la paroi polymérique (27).

Toutefois, la plupart des « nanocapsules » possèdent un réservoir lipidique permettant l'incorporation de molécules hydrophobes.

Les « *nanosphères* » sont des nanoparticules polymériques colloïdales matricielles ; de structure entièrement solide, pleines ou poreuses. Les « nanosphères » pleines sont des structures nanométriques compactes, de formes généralement sphériques, synthétisées à base de polymères ou de copolymères. Pour exemple, les nanoparticules de poly-(alkyl cyanoacrylate) (PACA), biocompatibles et biodégradables, sont étudiées comme vecteurs de molécules dans différents types d'applications (vectorisation de drogues anticancéreuses) (31).

Les *dendrimères*, catégorie émergeante de nanoparticules, sont des structures nanométriques formées de plusieurs séries de branchements organisés, reliés par un cœur moléculaire (32). Les dendrimères sont des « nanovecteurs » très intéressants. Grâce à ce système de branchement, ils offrent la possibilité d'effectuer plusieurs types d'associations chimiques sur différents groupes terminaux. Les molécules transportées sont insérées entre les branchements ou associées chimiquement à ceux-ci. Les propriétés des dendrimères dépendent de la nature chimique du cœur moléculaire et des branchements (33).

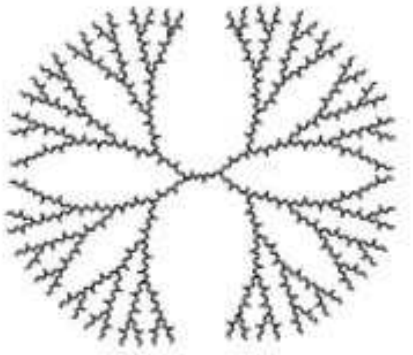

Figure 6 : Représentation de *dendrimère,* macromolécule ramifiée tridimensionnelle qui peut accueillir et fixer une molécule de médicament (28)**.**

2. Imagerie médicale et oncologie

2.1. Applications à l'oncologie

Les progrès en nanotechnologie suscitent l'espoir de nouveaux traitements du cancer, plus efficaces, mieux ciblés et mieux tolérés. Les nanoparticules, de part leur taille, leurs propriétés physiques et leurs interactions avec les tissus vivants, peuvent répondre à certains critères et se concentrer à un endroit précis de l'organisme par exemple.

Les nanoparticules peuvent être utilisées selon les principes suivants : (i) la délivrance ciblée de molécules thérapeutiques, (ii) l'exploitation de caractéristiques propres aux nanoparticules pour la thérapie.

2.1.1. Délivrance ciblée de molécules thérapeutiques à visée anticancéreuse.

La chimiothérapie conventionnelle, apparue dans les années 1940 repose sur l'administration de drogues « non spécifiques », cystostatiques et cytotoxiques.

Il est nécessaire de proposer de nouvelles stratégies plus ciblées, basées sur des médicaments dirigés spécifiquement contre les altérations moléculaires responsables de cancers, et administrés spécifiquement au site tumoral plutôt que de manière généralisée.

Les propriétés physiques des nanoparticules sont particulièrement adaptées au développement de stratégies innovantes pour la médecine. Elles constituent de petits « chevaux de Troie » permettant de transporter jusqu'à la tumeur des agents cytotoxiques pour la thérapie améliorant considérablement leur propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. La nanotechnologie offre la possibilité d'un ciblage à deux niveaux. Le ciblage moléculaire consiste à concevoir des médicaments capables d'interagir spécifiquement avec une cible moléculaire pour neutraliser son action (ciblage de l'activité enzymatique de protéine). Le ciblage cellulaire consiste à diriger l'agent

thérapeutique vers un récepteur spécifiquement exprimé à la surface des cellules cancéreuses (anticorps, fragments peptidiques ou ligands complémentaires) (17). De plus, les nanoparticules sont couplées à des agents stabilisateurs pour permettre une diffusion prolongée dans l'organisme et réduire leur reconnaissance et l'opsonisation par le système immunitaire (17,29).

Les nanoparticules augmenteraient la concentration de drogues anticancéreuses au sein des cellules atteintes tout en limitant la toxicité de ces médicaments (34).

De nombreuses nanoparticules ont des utilisations possibles en oncologie. Quelques une seront brièvement décrites dans ce manuscrit.

Des formulations nano-particulaires organiques, telles que les liposomes, constitués de polymères organiques, de protéines ou de peptides, ont été largement exploitées pour la délivrance de molécules a visée anticancéreuse.

A titre d'exemples, mentionnons le Doxil® et l'Abraxane®, médicaments approuvés par la Food and Drugs Administration (Etats-Unis) pour le traitement clinique de différents cancers. Le premier constitue une formulation liposomale de Doxorubicine, utilisée depuis plus de dix ans pour traiter le sarcome de Kaposi, maladie opportuniste sévissant chez le patient atteint du VIH (Virus d'immunodéficience humaine), le cancer du sein et de l'ovaire. Le second est une formulation nano-particulaire d'albumine humaine couplée au Paclitaxel. Cette formulation a montré une toxicité réduite par rapport au Taxol® dans des essais pré-cliniques de phase 1 et a permis en phase 2 et 3 d'administrer des doses supérieures en Paclitaxel améliorant ainsi l'efficacité clinique, notamment dans le cancer du sein métastatique (17,34). D'autre part, des travaux réalisés sur la souris révèlent que l'effet anti-tumoral de telles nanoparticules serait bien supérieur à l'injection d'un médicament

anticancéreux tel que la Doxorubicine à dose équivalente (29).

L'Aroplatine® est un analogue structural de l'Oxaliplatine incorporé dans des liposomes multilamellaires. L'Oxaliplatine est un analogue du Cisplatine, agent alkylant de l'ADN dérivé du platine doté d'une puissante action anticancéreuse. L'Aroplatine® a été testé en phase 2 d'essai clinique chez des patients atteints de carcinome colorectal, réfractaires aux traitements conventionnels (5 Fluoro-uracile associé à l'acide folinique, Capécitabine, Irinotecan). Cette formulation liposomale est relativement bien tolérée et possède une activité anti-tumorale comparable à celle de l'Oxaliplatine (35).

Les nanoparticules d'or, décorées en surface par des oligonucléotides possèdent des propriétés intéressantes concernant l'administration de médicaments : bonne pénétration cellulaire, faible toxicité, et protection des principes actifs vis-à-vis de la dégradation. Ces nanoparticules d'or ont été recouvertes en surface d'un oligonucléotide portant un groupement aminé terminal libre condensé à un complexe du platine (IV). L'activité de ces nanoparticules a été évaluée *in vitro* sur des lignées cellulaires (ostéosarcomes humains, carcinome du poumon humain, cancer des cervicales et de la prostate). Les nanoparticules d'or sont 2 à 10 fois plus actives que le Cisplatine sur toutes les lignées, en raison d'une meilleure pénétration cellulaire et d'une meilleure biodisponibilité (36).

D'autres nanoparticules d'or ou d'argent sur lesquelles sont greffées des molécules thérapeutiques ont été proposées pour le traitement topique de maladie de peau comme le psoriasis ou le cancer.

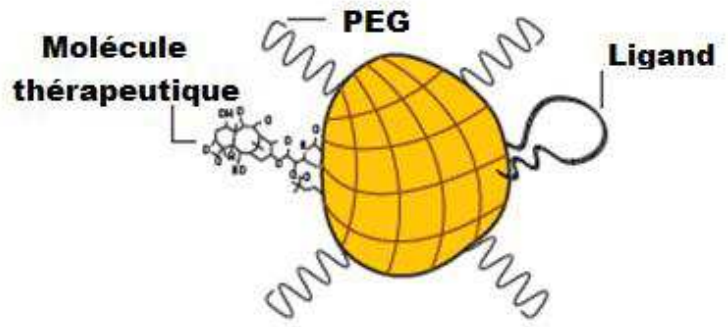

Figure 7 : Représentation d'une *nanoparticule d'or,* transportant une molécule thérapeutique. Du PEG et un ligand y sont greffés (28)**.**

Une meilleure biodisponibilité et un meilleur ciblage (tout en réduisant la toxicité des molécules) sont les avantages mis en avant par certains auteurs concernant l'utilisation de ces nanoparticules par rapport aux nombreuses molécules déjà présentes sur le marché (34).

Si de telles particules s'avèrent prometteuses, il reste néanmoins à déterminer leur toxicité à long terme car elles incluent des métaux tels que le cobalt, le manganèse ou le zinc non nécessairement pris en charge par le métabolisme de l'organisme. Leur utilisation chez l'homme n'est donc pas encore à l'ordre du jour.

2.1.2. Exploitation de caractéristiques propres aux nanoparticules

Les nanoparticules magnétiques (nanoparticules d'or, d'argent, nanotubes de carbone) sont également activables à distance et s'échauffent sous l'effet d'un champ magnétique oscillant à haute fréquence. Introduites au sein d'une tumeur, elles peuvent endommager les cellules cancéreuses en provoquant une hyperthermie locale.

Une des limitations de l'hyperthermie magnétique est le faible pouvoir chauffant des nanoparticules magnétiques usuelles. En conséquence, pour obtenir un effet thérapeutique, de fortes doses de nanoparticules doivent être injectées localement dans la tumeur. La plupart des études vise donc l'optimisation du pouvoir chauffant des nanoparticules magnétiques afin de réduire les doses injectées (17,37).

Un autre exemple de caractéristique propre aux nanoparticules exploitable en nano-médecine est la potentialisation des effets des rayonnements ionisants (radiothérapie anticancéreuse). Dans ce cadre, le produit NBTXR3® de la société Nanobiotix a reçu en juin 2013 l'autorisation de l'ANSM pour démarrer un nouvel essai clinique de phase 1 chez une population cible de patients atteints de carcinome épidermoïde localement avancé de la cavité buccale ou de l'oropharynx.

Cet essai clinique de phase 1 est une étude ouverte, non randomisée, avec escalade de doses évaluant la toxicité et le profil de tolérance du produit. NBTXR3® est implanté par injection intra-artérielle ou intra-tumorale et activé par radiothérapie de haute précision (radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité ou IMRT), conformément à la pratique médicale.

Les objectifs secondaires de l'étude incluent l'évaluation de la réponse complète et globale par IRM et l'évaluation de la survie sans progression locale et générale (38).

Cette étude représente la deuxième indication du développement clinique du NBTXR3®, actuellement en cours d'évaluation chez des patients atteints d'un sarcome des tissus mous.

L'activation par rayons X de ce type de nanoparticules génère des électrons provoquant la destruction des cellules cancéreuses. Cette approche, en réduisant les doses de radiothérapie nécessaire, limite les dommages des tissus sains et effets indésirables (39).

2.2. Applications à l'imagerie

Les nanoparticules inorganiques possèdent des propriétés particulières de conductivité, de magnétisme, de biocompatibilité, de réactivité, et de fluorescence les rendant attractives dans différentes applications y compris en diagnostic médical. Plusieurs études internationales démontrent l'intérêt que présente l'utilisation de nanoparticules dans le domaine médical, en tant qu'agents de contraste en imagerie par résonnance magnétique particulièrement.

Les agents de contraste sous forme nano-particulaire peuvent devenir des outils efficaces afin d'améliorer les diagnostics médicaux et la chirurgie assistée par imagerie. L'utilisation de nanoparticules s'avère intéressante par rapport aux agents de contraste iodés, barytés ou complexes de gadolinium par l'amélioration de la biocompatibilité, des capacités de détection *in vivo* et de ciblage. Néanmoins, il faut garder à l'esprit l'incomplétude des données toxicologiques à ce sujet.

Certains types de nanoparticules apparaissent depuis toujours comme agents de contraste. C'est le cas de certaines nanoparticules d'oxydes métalliques.

Les premières nanoparticules ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) sont des nanoparticules à base d'oxydes de fer (Fe_2O_3), développées comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM) chez l'homme (40). On retrouve notamment certains produits tels que l'Endorem® utilisé dans l'imagerie du cancer du foie, produit par le laboratoire Guerbet, le Feridex® permettant la détection de lésions du foie, AMAG Pharmaceuticals, le Lumirem® dans l'imagerie du tube digestif, laboratoire Guerbet, le Combidex® dans l'imagerie des ganglions lymphatiques du cancer de la prostate et le Resovist® utilisé pour la détection de lésions du foie, laboratoire Schering. Ce sont des nanoparticules constituées d'un cœur d'oxyde de fer, très sensible à l'exposition à un champ magnétique externe, enrobé par des agents de fonctionnalisation (principalement des dérivés de dextran, silicone et citrate). Le dextran est le polymère le plus employé dans la conception de ces produits. En effet, il permet de prolonger la demi-vie

plasmatique des nanoparticules *in vivo* comparé à d'autres polysaccharides comme le mannose ou le galactose.

Ces systèmes nano-particulaires présentent des tailles variables qui conditionnent leur biodistribution. On peut ainsi classer les agents de contraste superparamagnétiques constitués de nanoparticules d'oxyde de fer en deux catégories : les USPION (Ultrasmall Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles) de taille inférieure à 50 nm (imagerie du cerveau, diagnostic des pathologies ischémiques) et les SPION (Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) qui possèdent une taille supérieure à 50 nm (applications intéressantes dans l'imagerie par voie parentérale du foie, de la rate, du tractus gastro-intestinal et des ganglions lymphatiques) (40). De façon générale, les nanoparticules inorganiques possèdent des caractéristiques d'absorption et de diffraction de la lumière qui les rendent intéressantes comme agent de contraste en imagerie.

Le développement d'agents de contraste, de sondes fluorescentes, de traceurs et « bio-senseurs », associés au développement de stratégies de vectorisation et de ciblage, offre des perspectives pour l'imagerie du vivant. Lorsque ces dispositifs sont introduits sélectivement au sein de cellules cancéreuses, ils deviennent visibles et donc traçables par imagerie.

Les « bio-senseurs » fluorescents dérivent de structures biologiques (peptides, protéines ou polymères). Ils comportent un domaine de reconnaissance de la cible moléculaire, de son activité enzymatique ou de sa conformation et sont couplés à une ou plusieurs sondes fluorescentes dont les propriétés changent lors de la détection de la cible. Les changements dans les concentrations relatives, le comportement ou l'activité biologique et enzymatique d'une cible sont rapportés en temps réel par les « bio-senseurs » (41). Par ailleurs, ils offrent une solution sensible et non-invasive pour la détection de bio-marqueurs cancéreux par imagerie optique de fluorescence, palliant les inconvénients de la biopsie. Les bio-marqueurs constituent une caractéristique biologique

mesurable (protéines, acides nucléiques, métabolites), liée à un processus normal ou non.

Toutefois, l'administration de « bio-senseurs » fluorescents *in vivo* reste limitée à ce jour car elle dépend du développement de stratégies de vectorisation et de ciblage.

Ainsi les traceurs et « bio-senseurs » fluorescents doivent être complexés à des nanoparticules organiques ou conjugués à des nanoparticules inorganiques ou à des nanotubes afin d'assurer une internalisation cellulaire efficace et le ciblage de cellules cancéreuses (17).

Il est également possible de concevoir des nanoparticules qui permettent simultanément de visualiser et de traiter certaines tumeurs. Deux types de nanoparticules offrent ce type s'applications.

D'une part, les nanoparticules dites « passives », c'est-à-dire transportant des agents photosensibilisants (37). C'est le cas de la nanoparticule de silice. Il s'agit d'un matériau poreux biocompatible qui émet une luminescence en se dégradant permettant ainsi le diagnostic mais aussi le traçage des cellules cancéreuses *in vivo*. Il convient ensuite de fixer des ligands de surface afin de cibler les cellules malades et d'incorporer des molécules thérapeutiques dans les pores (37,42). Parmi les nanoparticules « passives » citons également les nanoparticules d'or et les polymères biodégradables.

D'autre part, les nanoparticules dites « actives » comme le TiO_2, elles-mêmes à l'origine de l'effet photo-catalytique. Ce type de nanoparticule est susceptible de générer des radicaux libres oxygénés très réactifs en présence d'eau et sous rayonnements UV. Ces radicaux libres entraînent la destruction des cellules malades (37). Cependant, des avancées techniques demeurent nécessaires et la toxicité de la plupart des structures étudiées constitue un obstacle majeur pour leur application chez l'homme.

Les inconvénients des cette technique comme l'addition de produits chimiques organiques toxiques ou le recours aux nanocristaux semi-conducteurs afin d'assurer la propriété de luminescence dans

les autres formes de particules développées, risquent d'occasionner une accumulation dans le corps - notamment au niveau du foie - de métaux potentiellement toxiques.

3. Antiseptiques : l'exemple des nano-argents

L'argent était déjà utilisé pour ses propriétés antiseptiques dans l'antiquité. Ravelin, savant français démontre au XIX^{ème} siècle que l'argent métal à l'état divisé, agit à dose extrêmement faible, comme un puissant bactéricide. Peu après, un médecin allemand Brenno Crede met en évidence que l'argent en solution colloïdale c'est-à-dire en suspension dans l'eau distillée, élimine à faible dose de très nombreuses bactéries tout en restant très peu toxique pour l'homme dans des conditions normales d'utilisation.

L'argent sous forme nano-particulaire semble aujourd'hui très prometteur en raison de ses propriétés biocides, de son action anti-inflammatoire, et des applications médicales qui en découlent (43). Les nanoparticules d'argent possèdent des propriétés très intéressantes comparées à de nombreux antibiotiques, en raison de leur effet antibactérien. De plus, il n'y a pas de risque d'allergie, les phénomènes de résistance sont modérés et l'argent n'interfère pas avec les antibiotiques (44).

La méthode de préparation la plus efficace d'une solution colloïdale d'argent est l'électrolyse. Il s'agit d'une réaction chimique sous l'action d'un champ électrique qui permet la formation d'argent métal nano-particulaire (Ag°), avec des proportions variables de cations argent (Ag^+).

Sous l'action du courant électrique l'anode libère des atomes d'argent (Ag°) sous forme de nanoparticules, lesquelles possèdent une surface active beaucoup plus importante que les atomes d'argent élémentaire « classique », ce qui leur confère de remarquables propriétés, surtout bactéricides.

L'objectif est de limiter la formation de particules d'argent chargées positivement (Ag^+), fortement bactéricides, mais très toxiques pour certaines espèces vivantes notamment les animaux à sang froid

(poissons et les batraciens) (43).

Parmi les applications industrielles des nanoparticules d'argent, on compte l'incorporation d'argent dans des vêtements comme les chaussettes afin de neutraliser les odeurs (45), mais aussi dans les emballages alimentaires dans le but d'inhiber la prolifération de microorganismes et de garantir ainsi une meilleure conservation des aliments (46).

II. Applications en dermo-cosmétique

L'industrie cosmétique tend sans cesse à améliorer les propriétés des produits cosmétiques : tenue, transparence, brillance et propriétés optiques. A cet effet, des études ciblent l'utilisation de nanoparticules en nano-dispersions et en microémulsions dans les formulations cosmétiques. Les industries cosmétiques utilisent les formes nano-particulaires de leurs ingrédients afin d'améliorer la protection contre les ultra-violets, la pénétration cutanée, la tenue de leur produit, la couleur, l'éclat etc. (47). Il est admis que les plus grandes industries cosmétiques utilisent largement les nanoparticules dans leur formulation comme le démontre ce graphique.

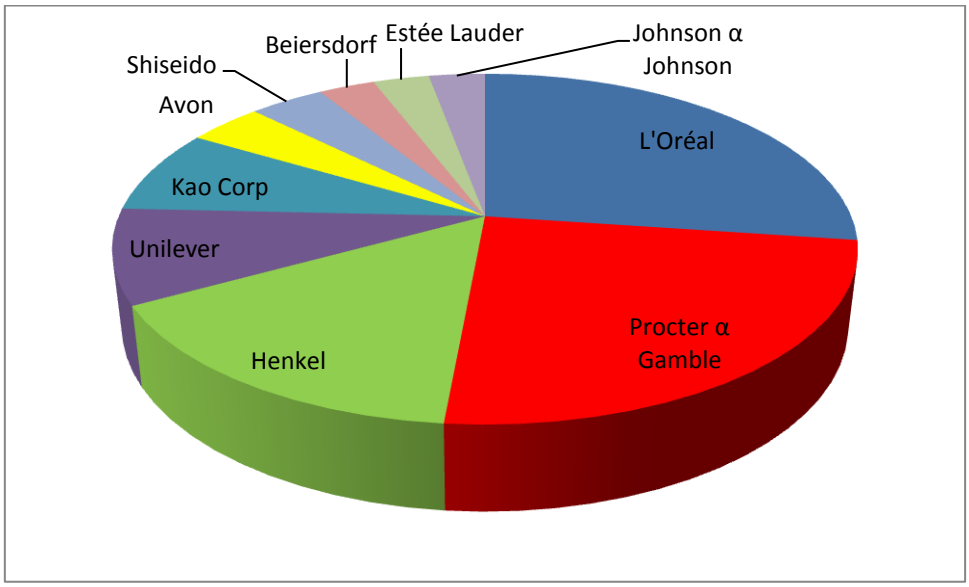

Figure 8 : Représentation du marché des nanoparticules dans l'industrie cosmétique (47).

Le marché concernant les nanoparticules destinées à la cosmétique en 2012 est évalué à 155,8 millions de dollars (47)

1. Nanoparticules utilisées en cosmétique

Différents types de nano-éléments sont produits en vue d'une application dans le domaine de la cosmétique. Journal of pharmacy and Bioalled sciences en fait la synthèse dans son article *Nanotechnology in cosmetic, opportunities and challenges*, 2012 (47). Seules les nanoparticules les plus couramment utilisées seront évoquées. On retrouve entre autres :

Les *liposomes*. Ces structures permettent une meilleure absorption des principes actifs par la peau par fusion de leur bicouche lipidique avec la membrane cutanée.

Les *nanoémulsions*. Ce sont des dispersions de gouttelettes nanométriques. Leur petite taille fournit une plus grande stabilité, améliore la performance des ingrédients actifs et la durée de conservation du produit.

Les *nanocapsules*. Ce sont des particules nanométriques faites d'une capsule de polymère entourant un noyau aqueux ou huileux. Il a été constaté que l'utilisation de nanocapsules diminuerait la pénétration de certains filtres UV dans la peau de porc comparé aux émulsions classiques.

Les *nanoparticules lipidiques solides*. Ce sont des gouttelettes huileuses solides à températures corporelles et stabilisées par des tensioactifs. Elles permettent de protéger les ingrédients encapsulés, de contrôler la délivrance des agents cosmétiques et d'améliorer la pénétration de composés actifs dans la couche cornée.

Les *nanoparticules d'or et d'argent*, peuvent également être intégrées dans ces formulations en raison de leurs propriétés antibactériennes.

Les *« cubosomes »* sont formés par auto assemblage de particules liquides cristallines et de tensioactifs. Les *« cubosomes »* offrent une grande surface, une faible viscosité et peuvent exister à n'importe quel niveau de dilution. Ils sont capables de transporter des molécules hydrophiles ou hydrophobes. En raison du faible coût des matières premières et de leur potentiel dans la libération contrôlée grâce à la fonctionnalisation, ils sont un choix attractif pour le secteur cosmétologique.

Les *hydrogels* sont des structures en trois dimensions constituées de réseaux de polymères hydrophiles qui peuvent s'hydrater et gonfler dans l'eau et les liquides biologiques sans dissoudre la substance « encapsulée ».

Enfin, *les fullerènes* entrent dans la composition de nombreuses crèmes pour le visage très coûteuses car ils constituent un capteur de radicaux libres. Ils peuvent également être utilisés comme pigments. Les compositions cosmétiques dans lesquelles les fullerènes sont utilisées concernent essentiellement le maquillage du visage (ombres à paupières, eye-liners, mascaras, poudres, fonds de teint, fards à joues, crèmes teintées, des rouges à lèvres, sticks anticerne, vernis à ongles, etc.).

Dans les compositions cosmétiques, le fullerène ou les mélanges de fullerènes sont généralement présents en une teneur comprise entre 0,01 et 50 % en poids par rapport au poids total de la composition, celle-ci étant dépendante de l'effet cosmétique recherché.

Les compositions cosmétiques de maquillage contiennent, des pigments supplémentaires référencés dans le *Colour index.*

Dénomination	Codification
Dioxyde de titane	CI 77891
Noir	CI 77499
Jaune	CI77492
Violet de manganèse	CI 77742
Bleu outremer	CI 77007
Bleu ferrique	CI 77510

Tableau 2 : Quelques pigments minéraux référencés dans le *Colour index*

2. Protection solaire

On constate ces dernières années une augmentation des cas de cancers cutanés épithéliaux et mélanomes. L'utilisation des crèmes solaires est alors proposée comme un élément important de prévention des cancers cutanés (48).

Les crèmes solaires classiques utilisent des éléments chimiques organiques capables d'absorber les rayonnements ultra-violets. Une des principales applications des nanoparticules dans le domaine dermo-cosmétique est leur utilisation en tant que filtre anti-UV.

Les particules de dioxyde de titane (TiO_2) et d'oxyde de zinc (ZnO) sont utilisées depuis de nombreuses années dans les crèmes solaires en tant que filtres anti-UV. Ces particules ont la capacité d'absorber et de refléter les rayonnements UV conférant ainsi une photo-protection. Etant visibles, ces particules laissaient un film blanc sur la peau. La réduction de leur taille aux dimensions nanométriques a permis l'élaboration de crèmes solaires « invisibles » tout en conservant leur propriété photo-protectrice (49). Les nanoparticules des TiO_2 utilisées en tant que

filtres inorganiques sont généralement sous forme cristalline (rutile le plus souvent, anatase, ou mélange des deux). Concernant le ZnO, la forme cristallographique la plus stable thermodynamiquement est la structure hexagonale compacte (de type Würtzite). Son aptitude à réfléchir la lumière UV fait du ZnO un élément de choix pour son utilisation en tant que filtre UV dans les produits de protection solaire.

Les particules formulées dans les crèmes solaires peuvent être enrobées d'alumine, de silice, mais aussi de substances organiques telles que le diméthicone ou l'acide stearique afin d'améliorer leur stabilité, l'incorporation dans les formules et d'empêcher d'éventuelles réactions chimiques (diminution de l'effet photo-catalytique réduisant la production d'oxydants).

D'autres structures nano-particulaires telles que les liposomes sont utilisées d'une part pour leur propriété de « bloqueurs » de photons, d'autre part afin d'augmenter la pénétration grâce à la présence de la bicouche phospholipidique.

Un autre avantage de ce type de formulation est l'homogénéité de la distribution sur la surface cutanée après application apportant ainsi une photo-protection maximale à la différence des crèmes de formulation huile/eau qui présentent une répartition hétérogène en raison de l'orientation des composés lipophiles au niveau des régions hydrophiles de la couche cornée (6).

Partie 3 : Toxicologie et voies d’exposition aux nanoparticules

I. Toxicologie des nanoparticules

En raison des multiples perspectives d'utilisation des nanomatériaux et de leur croissance attendue ces prochaines années dans des domaines tels que l'industrie, la médecine ou encore l'environnement, les expositions humaines sont potentiellement nombreuses et importantes (2). La détermination de ces expositions passe au préalable par l'identification de l'ensemble des produits et des milieux pouvant contenir des nanoparticules (50).

Les connaissances actuelles des effets notamment respiratoires et cardiovasculaires des particules nanométriques ou particules ultrafines issues de la pollution atmosphérique (51) font craindre des incidences sur la santé dues aux nanoparticules issues des activités anthropiques et plus encore des nanoparticules manufacturées. Les nanoparticules issues de la pollution atmosphérique présentent des propriétés toxiques qui peuvent s'appliquer aux nanoparticules manufacturées retrouvées au sein de nombreux composés domestiques. Lors de ces expositions, il est avancé que les nanoparticules sont susceptibles de pénétrer dans l'organisme par voies cutanées, respiratoires ou encore digestives (20).

1. Les sources d'exposition de la population générale aux nanomatériaux

L'*exposition* est définie comme le contact dans le temps et l'espace entre une personne et un ou plusieurs agents biologiques, physiques ou chimiques. L'évaluation de l'exposition a pour but de définir les cas d'exposition réels ou possibles dans une population humaine ou un système biologique. L'exposition humaine aux nanoparticules peut avoir lieu en milieu professionnel ou environnemental, et en tant que consommateur (12). Deux types d'exposition de la population générale aux nanoparticules peuvent être distingués. D'une part, les expositions dites « directes » c'est-à-dire les expositions quotidiennes aux nanomatériaux contenus dans les produits de consommation courante : produits d'hygiène corporelle et domestiques, médicaments, emballages

alimentaires, vêtements et textiles, prothèses médicales, etc.

D'autre part, les expositions dites « indirectes » : les nanoparticules se retrouvant dans l'environnement suite à l'usure, à la dégradation ou à la fin de vie des composés contenant ces « nano-objets ». Citons l'exemple des nanoparticules contenues dans les pneumatiques, les encres, les carburants, les appareils électroniques, les textiles, les films de vitrages, les panneaux solaires, etc. (52). Dans ce contexte d'expositions indirectes, la caractérisation des expositions humaines passe par la compréhension préalable des phénomènes de dégradation, d'émission, de transport et d'accumulation dans l'environnement (12).

2. Principaux facteurs déterminant les effets toxicologiques des nanoparticules

Les principaux facteurs déterminant la toxicologie des nanoparticules manufacturées sont : *les facteurs concernant l'exposition* : voies, importance et durée de l'exposition ; *les facteurs concernant l'individu exposé* **:** susceptibilité individuelle, interaction des nanoparticules avec les composants biologiques, évolution des nanoparticules après leur entrée dans l'organisme et *les propriétés physico-chimiques des nanoparticules* (53).

Ainsi, dans le cas des nanoparticules, la composition chimique n'est pas seule à influencer leur potentielle toxicité. D'autres propriétés, notamment leur **taille**, jouent un rôle dans celle-ci, permettant aux nanoparticules d'échapper aux mécanismes de défense de l'organisme et d'interagir avec les constituants biologiques (ADN).

L'impact des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules manufacturées sur leurs effets toxiques est loin d'être défini et définitif. Cependant, les données obtenues sur les conséquences toxicologiques des nanoparticules issues de la pollution atmosphérique, permettent de penser que certains facteurs seraient impliqués dans les effets toxicologiques des nanoparticules manufacturées. Parmi ces paramètres, citons : *la taille*, pouvant altérer les propriétés physico-chimiques des

molécules et ainsi augmenter la réactivité avec les tissus biologiques par la production de radicaux libres oxygénés ; *l'aire et la réactivité de surface* ; *le nombre* ; *la composition chimique* et particulièrement la capacité à produire des formes réactives de l'oxygène ; *la forme* ; *la solubilité* ; *la capacité à former des agrégats ou des agglomérats* ; *les traitements de surface* ; *la structure* ; *la cristallinité* ; enfin, d'autres paramètres tels que les méthodes de fabrication et l'usure des nanomatériaux manufacturées entrent également en considération (11,53).

II. Voies et conditions de pénétration

1. Pénétration cutanée

1.1. La peau : rappels anatomiques

La peau est constituée d'environ 70 % d'eau, 27 % de lipides, 2 % de protéines et d'environ 1 % d'oligo-éléments. La peau est l'organe du corps humain le plus étendu et le plus lourd, c'est un tissu de revêtement très souple, résistant et imperméable.

Elle constitue la couche corporelle protectrice externe mais elle est également impliquée dans différents processus fondamentaux tels que la régulation de la température corporelle, la défense immunitaire, le métabolisme (synthèse des vitamines D, hormones, sébum), ou encore la perception sensorielle.

Elle est constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est la couche la plus externe, protectrice. L'épaisseur moyenne de l'épiderme est de 100 μm mais peut varier de 50 μm au niveau de la paupière à 1 mm au niveau de la paume de la main ou de la plante des pieds.

A la surface de la peau sont présents des follicules pileux d'où émergent des poils, ainsi que des pores où s'ouvrent les glandes sudoripares et sébacées. Elle présente également des sillons formant

les empreintes digitales (54).

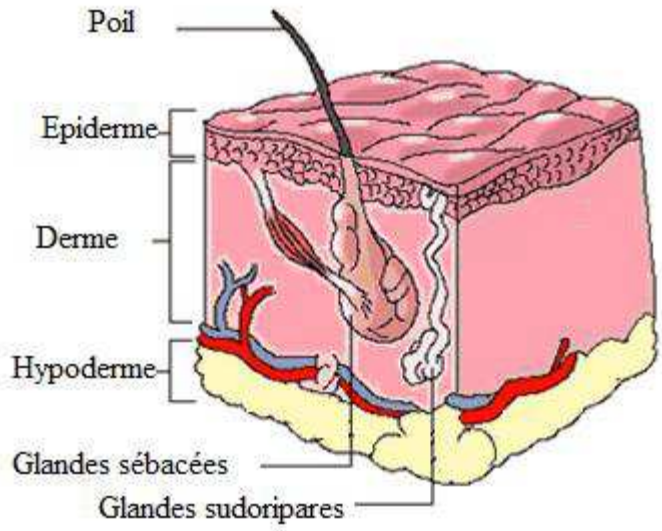

Figure 9 : Représentation anatomique de la peau et de ses annexes.

1.2.L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux pluristratifié épais, kératinisé et non vascularisé. Il est en constant renouvellement. C'est un tissu de recouvrement comprenant cinq couches successives. La plus profonde est la couche basale ou germinative, puis vient la couche épineuse, la couche granuleuse et enfin la couche cornée (*stratum corneum*), couche la plus superficielle.

La couche cornée se compose d'environ une vingtaine de couches de cellules mortes. C'est une couche de kératine, composée de cornéocytes et résistante aux changements chimiques. La couche cornée assure plusieurs fonctions de la peau. Elle la protège contre les agressions extérieures (chaleur, froid, sécheresse, déshydratation) et agit également comme une barrière en empêchant la pénétration dans l'organisme d'éléments extérieurs (agents microbiens, poussières, etc.).

La partie superficielle de la couche cornée desquame progressivement au fur et à mesure que ses cellules se détachent de l'épithélium plus profond.

L'épiderme, est un tissu particulièrement exposé aux atteintes physiques, chimiques ou

microbiennes du monde extérieur. Il assure à l'organisme une barrière protectrice grâce à l'élimination progressive de ses parties les plus superficielles, perte compensée par un renouvellement cellulaire continu à partir de cellules souches et évitent la déshydratation de l'organisme. L'épiderme est constamment renouvelé tous les 25 à 40 jours.

L'épiderme est composé à près de 95% de kératinocytes produisant la kératine. La kératine est une protéine fibreuse, insoluble, constituée en majorité d'acides aminés soufrés (cystéine) formant des ponts disulfures conférant ainsi une rigidité à l'ensemble. Toutes les cellules de l'épiderme sont reliées entre elles par des structures appelées les desmosomes.

Les mélanocytes, présents dans l'épiderme, synthétisent un pigment, la mélanine (melas = noir). Cette variété de cellules se situe plus profondément dans l'épiderme, mais reste néanmoins en contact avec les kératinocytes qui intègrent progressivement la mélanine fabriquée par les mélanocytes. Les pigments de mélanine ainsi absorbés protègent notamment l'ADN des cellules épithéliales contre les effets néfastes des rayonnements solaires (ultraviolets A, B et C). D'autres variétés de cellules présentes dans l'épiderme sont des cellules circulantes du système immunitaire et servent essentiellement à la défense de l'organisme (54).

1.3.Fonction barrière de la peau

La peau constitue une frontière mécanique, physique, chimique et immunologique. Elle joue le rôle de barrière de protection contre les agressions externes multiples (rayonnements, micro-organismes, substances chimiques, allergènes…) et évite la déshydratation de l'organisme. Elle est également le siège de nombreux processus métaboliques et assure des fonctions sensorielles, immunitaires et thermorégulatrices (55).

La notion de «barrière cutanée» se réfère à la fonction de la couche cornée qui est la couche externe de l'épiderme. D'un point de vue physiologique et fonctionnel, la fonction barrière résulte d'une organisation tissulaire et biochimique bien spécifique et particulière au niveau protéique, lipidique et enfin au niveau de la composition et de la distribution ionique (55).

1.4.Limites de la « barrière cutanée »

Cette barrière demeure incomplète car elle laisse passer certaines substances (caféine), certains toxiques (alcool, acide salicylique, iode), et peut être amoindrie par des effractions cutanées, des maladies cutanées (psoriasis, eczéma) ou encore un effet occlusif (sous un pansement ou corps gras, par exemple).

Elle est perméable à pratiquement toutes les substances, seul le degré de perméabilité varie.

Différents paramètres peuvent influencer l'efficacité de la fonction barrière de la peau : *l'équilibre physico-chimique de la couche cornée* (hydrophobicité, lipophilie, sécrétion de sébum) ; *le pH cutané*, important puisqu'il conditionne l'ionisation et la capacité d'absorption des principes actifs. Ce pH est variable sur les divers endroits du corps, mais aussi en fonction de la sueur, des sécrétions séborrhéiques, ou des pathologies de la peau. La peau est environ à pH 5, mais le pH des cosmétiques appliqués peut faire varier celui-ci; *l'intégrité biologique de la peau* : l'état de la peau est un facteur essentiel. Une peau dont la fonction barrière est lésée (brûlures, cicatrices, eczéma…) favorisera la pénétration d'agents exogènes ; *l'âge du sujet* : des différences de perméabilité sont observées entre l'enfant et le sujet âgé, notamment en raison de différence d'hydratation, d'absence de glandes sébacées, d'une kératinisation moins importante chez l'enfant et d'un amincissement de l'épiderme chez les personnes âgées ; *l'épaisseur de la peau* : l'épaisseur de l'épiderme et surtout de la couche cornée a un impact sur l'efficacité de la fonction barrière. Pour exemple, les zones palmoplantaires sont relativement peu perméables compte tenu de l'épaisseur de la couche cornée (55) ; *l'espèce considérée* : par rapport aux autres espèces, la peau humaine est généralement la

peau la moins perméable aux substances chimiques (56).

1.5.Les voies de pénétration cutanée

L'absorption percutanée correspond au transfert d'une substance à travers la peau depuis le milieu extérieur jusqu'au sang. L'étape de pénétration est une diffusion passive. Elle dépend du gradient de concentration des molécules existantes dans le véhicule et de la surface épidermique. Une fois absorbée, la substance est distribuée dans l'organisme puis, après avoir été ou non métabolisée, c'est-à-dire transformée par l'organisme, est éliminée. Au sein de l'épiderme, la couche cornée est reconnue comme barrière à la diffusion.

Anatomiquement, deux voies sont possibles pour la pénétration des particules : l'une, par diffusion passive, à travers les espaces intercellulaires de la couche cornée et à travers les cellules cornées elles-mêmes dite *voie transépidermique* ; l'autre empruntant les annexes cutanées comme les follicules pilo-sébacés et/ou les glandes sudoripares, dite *voie transannexielle*.

La pénétration ne s'effectue pas uniquement par l'une des voies, les deux participent au phénomène. La pénétration globale résulte donc à la fois d'un passage transépidermique et transannexiel (55).

2. Pénétration respiratoire

2.1.Rappel : Anatomie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est l'ensemble des organes dont la fonction est d'assurer la respiration permettant les échanges gazeux entre l'air et le sang. A l'appareil respiratoire, sont annexés l'appareil olfactif et une partie de l'appareil phonatoire (57).

D'un point de vue anatomique, l'appareil respiratoire comprend les voies aériennes, les poumons, la plèvre, la circulation pulmonaire et les muscles respirateurs insérés sur la paroi thoracique.

Les voies aériennes sont divisées en voies aériennes supérieures et voies aériennes inférieures. Les

voies aériennes supérieures sont situées dans la face et le cou et comprennent les fosses nasales (annexées à l'olfaction), les sinus paranasaux, le pharynx (carrefour avec l'appareil digestif), et le larynx (annexé à la phonation) (57). Les voies aériennes inférieures sont situées dans le cou et le thorax. Elles sont composées de la trachée et de l'arbre bronchique jusqu'aux alvéoles pulmonaires.
Les poumons, entourés de la plèvre, sont les deux organes parenchymateux où se produisent les échanges gazeux entre l'atmosphère et la circulation pulmonaire ou petite circulation.
La paroi thoracique entoure la cavité thoracique où se situent les poumons. Elle est mobile grâce à l'action des muscles respirateurs (58).

Les voies aériennes sont couvertes d'un épithélium, qui est un tissu composé de cellules épithéliales jointives et solidaires les unes des autres grâce à des jonctions intercellulaires. Les alvéoles sont elles-mêmes composées de trois couches : les cellules épithéliales, l'interstitium et une couche d'endothélium. L'interstitium est composé d'un tissu conjonctif qui soutient les cloisons alvéolaires (58).

2.2.La muqueuse respiratoire

La muqueuse respiratoire est présente depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles terminales intra-pulmonaires. Elle se compose d'un épithélium, d'une lame basale d'une épaisseur d'environ 1000 Å et d'un chorion. Le chorion est un tissu conjonctif lâche constitué d'éléments caractéristiques : Le MALT / BALT (Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses / aux Bronches), système de veille immunologique. Ce chorion présente un infiltrat lymphocytaire (sous forme de lymphocytes isolés ou regroupés en follicules primaires et secondaires), des monocytes et des macrophages ainsi que des cellules pro-inflammatoires, comme les mastocytes ou les polynucléaires. Sont également présentes des glandes séreuses qui sécrètent des solutions protéiques très fluides ainsi que des glandes muqueuses qui sécrètent des mucines.

Plusieurs types d'épithéliums sont présents au niveau de l'appareil respiratoire : *l'épithélium pseudo-stratifié* qui est un épithélium simple (une seule assise de cellules), mais qui ressemble, sur des coupes histologiques, à un épithélium stratifié (toutes les cellules sont en contact avec la lame basale mais toutes n'atteignent pas le pôle apical) ; *l'épithélium prismatique, ou cylindrique* : les cellules sont plus hautes que larges ; *l'épithélium cilié* : les cellules ciliées majoritaires sont pourvues de cils vibratiles apicaux. Ils participent à l'escalator muco-ciliaire, système de clairance spécifique des voies de conduction (58).

2.3.Fonction barrière de l'épithélium respiratoire

L'organisme dispose au niveau de l'appareil respiratoire de moyens de défense très diversifiés et sophistiqués contre les agressions des gaz et des particules de l'air ambiant.

Tout d'abord des moyens mécaniques. La disposition anatomique des voies aériennes et de l'arbre trachéobronchique favorise la déposition des particules. Il se produit donc une filtration nasopharyngée et trachéobronchique, et une évacuation mécanique par le tapis mucociliaire (58).
L'épithélium respiratoire est très actif grâce à des fonctions sécrétoires (production de mucus), des fonctions d'épuration par clairance mucociliaire, de transport d'ions et d'autres substances, mais aussi des fonctions d'adhérence bactérienne.
Le mucus forme un revêtement continu tapissant toutes les voies de conductions. Il a une triple fonction. Il assure l'humidification de l'air inspiré, la protection physique des cellules épithéliales et piège les particules. Les sécrétions bronchiques peuvent être assimilées à un milieu bi-phasique. D'une part, une phase *« sol »* aqueuse, profonde et fluide (ions, lipides, protéine) dans laquelle baignent les cils. D'autre part une phase *« gel »*, viscoélastique et superficielle, présente au sommet des cils (58,59).

Le mucus contient des mucines. Ce sont des macromolécules acides ou neutres de hauts poids moléculaires très hétérogènes. Ces chaînes polypeptidiques sur lesquelles sont fixés des groupes glucidiques représentent des sites de liaison pour les adhésines bactériennes et les virus, avant leur élimination mécanique par l'activité ciliaire.

Des moyens physico-chimiques constituent également un système de défense. Cela concerne toutes les surfaces de contact avec l'air inhalé en raison de la présence de revêtements de protection des parois (mucus des voies de conduction, surfactant alvéolaire).

Enfin, des moyens cellulaires. Ils jouent un rôle majeur au niveau de la zone alvéolaire : les macrophages alvéolaires (cellules à "poussières") prennent en charge les particules insolubles par phagocytose. Ils entourent les particules, les digèrent et les dirigent vers l'ascenseur muco-ciliaire pour l'élimination. L'efficacité de la phagocytose dépend de la forme, de la taille et de la quantité de particules présentes. En effet, ce système peut être saturé par un nombre trop important de particules à éliminer (9).

2.4.Limites de la « barrière respiratoire »

Les modulations physiologiques des réactions de défense de l'appareil respiratoire en réponse aux agressions des polluants aériens sont nombreuses.

Il peut se produire des changements de diamètre des voies de conduction : diminution du diamètre (bronchoconstriction) ou augmentation (bronchodilatation) ; des modifications de la fréquence respiratoire impliquant une oscillation de la fréquence d'entrée des polluants ; une variation des secrétions de mucus et de surfactant.

L'augmentation de la sécrétion de mucus, généralement accompagnée d'une broncho-dilatation, favorise : l'épuration muco-ciliaire des particules ; les expulsions réflexes (toux, éternuements) et

l'activation des moyens de défense cellulaire (phagocytose par les macrophages, réaction immune par les lymphocytes, mastocytes et cellules présentatrices de l'antigène).

En règle générale, ces réactions défensives tendent à empêcher la pénétration d'un polluant (gaz irritants, poussières…) dans la profondeur des voies de conduction aérienne et à accélérer l'épuration des polluants particulaires déposés sur les parois des voies de conduction.

Dans certains cas, les réactions de l'appareil respiratoire présentent des insuffisances. En particulier si l'agression est importante ou prolongée : une hypersécrétion de mucus risque d'encombrer les voies respiratoires et une inflammation chronique peut déclencher un processus de fibrose. Enfin, il faut garder présent à l'esprit que certains polluants peuvent déjouer les systèmes de défense en pénétrant l'appareil respiratoire sans provoquer la moindre réaction (monoxyde de carbone par exemple).

Aussi, les réactions de défense dépendent souvent de manière importante : des variations physiologiques entre les individus (âge, sexe ou susceptibilité génétique) ; du niveaux d'activité physique (effort intense) car l'augmentation de la ventilation et de la perfusion pulmonaire accroît le niveau d'exposition du sujet ; de son état de santé (asthme, bronchopneumopathie chronique obstructive) (58).

2.5. Pénétration et accumulation : déposition des nanoparticules dans les régions du système respiratoire

L'inhalation représente la principale voie d'exposition aux nanoparticules chez l'homme. Un nombre considérable de nanoparticules ou particules ultrafines sous forme d'aérosol existe dans l'environnement, en grande partie en raison du trafic automobile et des divers procédés industriels (20).

L'étude du dépôt des particules dans le système respiratoire révèle d'importantes différences concernant les sites de déposition. Le diamètre des particules inhalées, en particulier entre les particules de taille nanométrique et les particules de taille plus importante influence grandement leur dépôt.

Cinq mécanismes interviennent dans le dépôt de particules : *la sédimentation*, liée à la gravité agissant sur les particules ; *l'impaction inertielle*, qui caractérise le comportement des particules massives ; *l'interception*, qui se produit au moment où une particule entre en contact avec une surface ; *la diffusion*, liée au mouvement aléatoire des particules très fines et *l'attraction électrostatique*, pouvant influencer nettement le dépôt pour les particules fortement chargées (11).

Afin d'examiner la déposition des nanoparticules, le système respiratoire est divisé en trois régions : les régions naso-pharyngée, trachéo-bronchique et alvéolaire. Chaque région constitue un lieu de dépôt de nanoparticules de différentes tailles.

La morphologie de l'arbre respiratoire et les paramètres physiologiques varient de manière importante en fonction des individus et de leur activité.

L'âge, le sexe, les pathologies telles que les syndromes obstructifs (bronchopneumopathie chronique obstructive) et restrictifs (asthme) sont des éléments qui peuvent altérer le fonctionnement et la structure « normale » des voies respiratoires (11).

De manière générale, le plus faible dépôt est constaté pour les particules d'un diamètre d'environ 300 nm. A cette taille, les particules sont trop grosses pour que le mécanisme de diffusion soit important et trop petites pour que l'impaction et la sédimentation aient un effet (11).

La figure 10 représente le dépôt total et régional dans l'arbre respiratoire des particules en fonction de leur diamètre (compris entre 1 nm et 100 µm). Ces courbes correspondent à un sujet « référent », c'est-à-dire respirant majoritairement par le nez ou la bouche et passant un tiers de sont temps assis

et deux tiers de son temps en activité légère. Pour les particules de diamètre inférieur à 300 nm, le dépôt augmente de manière significative car la diffusion devient prédominante. Les nanoparticules de diamètre supérieur à 10 nm se déposent à plus de 50% au niveau alvéolaire, tandis que celles inférieures à 10 nm se déposent principalement en région extra thoracique (plus de 80%), et de manière moins importante dans la région trachéo-bronchique.

Notons qu'entre 10 nm et 200 nm, le mode de respiration a peu d'effets sur le dépôt des particules.

Ces importantes différences de lieux de déposition ont des conséquences sur les effets potentiels des nanoparticules dans le système respiratoire.

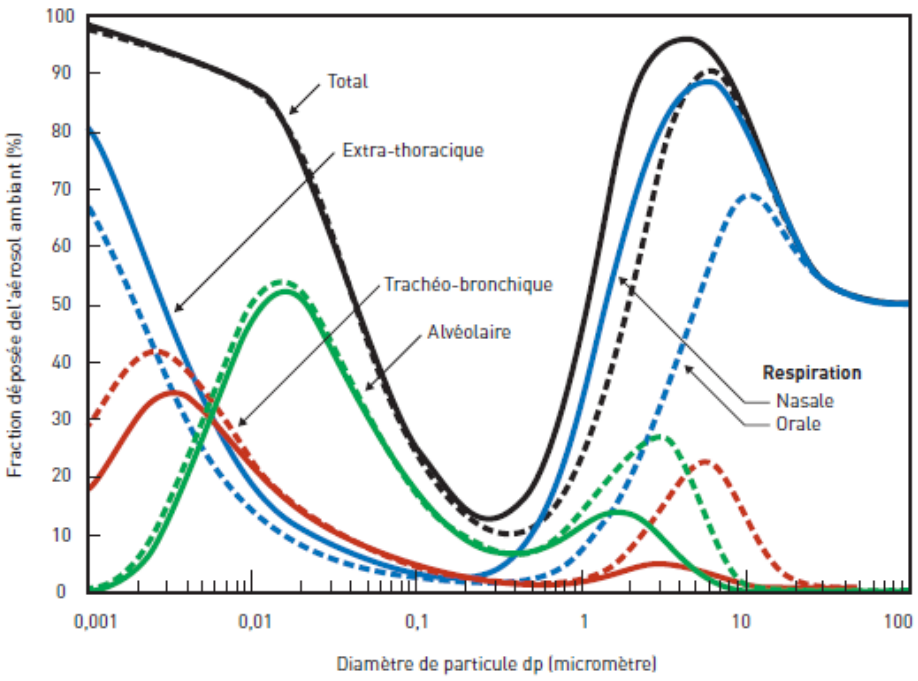

Figure 10 : Prédiction du dépôt de particules inhalées au niveau du système respiratoire chez l'homme en fonction du diamètre des particules. Le sujet respirant majoritairement par la bouche (pointillé) ou par le nez (ligne continue) (11)

Cas particulier : inhalation de poudre libre cosmétique

Une étude américaine s'intéresse à l'exposition et au risque d'inhalation des nanoparticules suite l'utilisation de poudres cosmétiques (blush, poudres minérales) (60). Parmi les six produits du commerce analysés, cinq présentent dans leur formulation des nanoparticules alors que seulement trois fabricants n'en revendiquaient la présence. La microscopie électronique à transmission est utilisée afin de déterminer la taille, la structure et l'agglomération des nanoparticules alors que la spectroscopie diffraction laser a pour but d'évaluer la dispersion des nanoparticules dans l'air ainsi que leur distribution en fonction de la taille. L'étude révèle que les nanoparticules contenues dans ces poudres sont essentiellement présentes sous forme d'agglomérats.

Afin de mimer les conditions réelles d'exposition aux nanoparticules contenues dans les poudres cosmétiques, la poudre a été appliquée sur des visages « artificiels » à l'aide du pinceau fourni par le fabricant. La distribution des particules en fonction de leur taille et leur concentration est ensuite déterminée. Les résultats révèlent dans ce cas une déposition de ces agglomérats essentiellement au niveau des voies aériennes supérieures. Les investigations doivent être poursuivies mais cette étude donne un exemple de méthodologie utilisable afin de déterminer quantitativement l'exposition aux nanoparticules contenues dans les cosmétiques en vue d'évaluer les risques toxicologiques liés à leur utilisation.

3. Ingestion

3.1. Rappel anatomique : l'appareil digestif

Le tube digestif s'étend de l'œsophage jusqu'au canal anal. Il est formé d'une paroi regroupant cinq tuniques concentriques. De l'intérieur vers l'extérieur, on distingue ainsi : *une muqueuse* constituée d'un épithélium reposant sur un chorion (tissu conjonctif). C'est la tunique la plus interne, en contact avec la lumière du tube digestif ; *une musculaire-muqueuse*, tunique fine faite de cellules

musculaires lisses ; *une sous-muqueuse*, constituée de tissu conjonctif ; *une musculeuse*, tunique épaisse constituée de cellules musculaires lisses ; *une adventice* faite de tissu conjonctif.

3.2.La muqueuse du tube digestif

Trois types d'épithélium présentant des morphologies et des fonctions différentes constituent le revêtement interne du tube digestif : un *épithélium de protection mécanique*, un *épithélium de protection chimique* et *un épithélium d'absorption*.

L'épithélium de protection mécanique est observé au niveau des deux extrémités du tube digestif (œsophage et canal anal). Il s'agit d'un épithélium pavimenteux stratifié. Il est non kératinisé sauf au niveau des 2/3 inférieurs du canal anal où il s'agit d'un prolongement de l'épiderme.

L'épithélium de protection chimique est localisé au niveau de l'estomac. Il s'agit d'un épithélium prismatique simple, c'est-à-dire formé de cellules plus hautes que larges, alignées en mono-couche. Ces cellules sont sécrétrices et dites à pôle muqueux fermé. C'est un épithélium sécrétoire. Le mucus produit par cet épithélium sécrétoire contribue à lubrifier la paroi gastrique et à la protéger de l'attaque du suc gastrique. L'épithélium gastrique s'invagine et forme de petites dépressions appelées cryptes au fond desquelles s'ouvrent les canaux excréteurs des glandes gastriques.

L'épithélium d'absorption est localisé au niveau de l'intestin. Il s'agit d'un épithélium prismatique simple constitué d'entérocytes et accueillant des cellules glandulaires isolées, les cellules caliciformes. Les entérocytes présentent une différenciation de leur pôle apical sous forme de microvillosités. Les microvillosités sont de petites expansions cytoplasmiques pouvant s'organiser sous deux formes : plateau strié encore appelé bordure en brosse et stéréocils. La fonction des entérocytes est l'absorption digestive des nutriments (c'est-à-dire des glucides, des protides, et des lipides) au niveau des microvillosités. De nombreuses enzymes sont présentes et vont permettre

d'achever l'hydrolyse des protides en acides aminés qui seront pris en charge par des transporteurs spécifiques de la membrane plasmique apicale. Au niveau de cet épithélium se trouvent aussi des cellules caliciformes. Ce sont des cellules glandulaires à sécrétion muqueuse participant à la lubrification du tube digestif.

L'organisation de cet épithélium d'absorption présente des variations régionales.

Au niveau de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon), les entérocytes sont beaucoup plus abondants que les cellules caliciformes et leur plateau strié constitue le dernier niveau d'un dispositif complexe d'amplification de la surface d'absorption. Ce dispositif comprend : *les anses intestinales* (replis de l'intestin), *les valvules conniventes* (plis transversaux permanents de la muqueuse et de la musculaire muqueuse), *les villosités intestinales* : expansions en doigt de gant de la muqueuse contenant des cellules musculaires lisses et des vaisseaux sanguins et lymphatiques, enfin, *les microvillosités* du plateau strié des entérocytes.

Au niveau du côlon et du rectum, les cellules caliciformes sont beaucoup plus nombreuses que les entérocytes. Il n'y a pas de système d'amplification de la surface intestinale.

3.3.Fonctions du tube digestif

Le tube digestif exerce essentiellement trois types de fonctions : *des fonctions digestives*, *des fonctions immunitaires* et *des fonctions endocrines*.

Les fonctions digestives sont assurées par trois constituants majeurs de la paroi digestive : l'épithélium de revêtement, qui participe au transit des aliments et à l'absorption des nutriments ; les glandes exocrines du tube digestif, qui protègent et lubrifient les parois du tube digestif et participent à la dégradation des aliments ; la musculature lisse du tube digestif, qui permet la progression et le brassage mécanique des aliments.

Les fonctions immunitaires sont assurées par les organes lymphoïdes du tube digestif.

Enfin, les fonctions endocrines sont assurées par les cellules endocrines disséminées dans l'épithélium du tube digestif et qui sécrètent des hormones digestives.

3.4. Pénétration et accumulation des nanoparticules dans le tractus gastro-intestinal

Les nanoparticules peuvent atteindre le système gastro-intestinal après avoir été ingérées *indirectement* (non intentionnellement) si contenues dans l'alimentation, l'eau ou encore présentes dans les cosmétiques et produits d'hygiène (rouges à lèvres, dentifrice), voire *directement* (intentionnellement) en tant que vecteurs de médicaments. Elles peuvent également accéder au système gastro-intestinal après déglutition lorsqu'elles sont inhalées (20). En effet, les nanoparticules inhalées se déposant sur l'arbre trachéo-bronchique peuvent être piégées dans le mucus qui tapisse la paroi des voies aériennes et transportées vers la cavité oro-pharyngée par mouvements mucociliaires. Ce mucus ensuite dégluti, transporte les particules vers le système gastro-intestinal. Notons que 98% des nanoparticules ingérées sont évacuées par les selles en 48 heures et une partie de la quantité restante par les urines. Cependant, un faible pourcentage de ces nanoparticules peut diffuser à travers le mucus, être absorbé par les entérocytes et gagner la circulation sanguine (1).

La pénétration des nanoparticules est favorisée par la superficie totale du tube digestif qui est d'environ 240 m^2 mais dépend aussi de leur taille et de leurs propriétés physico-chimiques comme la stabilité, ou la surface hydrophobe (61). La charge semble également intervenir dans la pénétration des nanoparticules (62). Pour exemple, les nanoparticules de latex chargées positivement sont piégées dans le mucus chargé négativement tandis que celles chargées

positivement traversent le mucus et peuvent interagir avec les cellules épithéliales (1,46).

Carrière *et al*, étudie *in vitro* (article en révision) la translocation de nanoparticules de TiO_2 à travers différents modèles d'épithéliums gastro-intestinaux : un modèle d'entérocytes (Caco2) ; un modèle traduisant la complexité de la barrière digestive (co-culture Caco2 –HT29-MTX ; entérocytes - cellule sécrétrice à mucus) ; un modèle complexe représentatif des cellules M (co-culture Caco2/RajiB).

Les cellules M jouent un rôle immunologique car permettent l'endocytose et la phagocytose. Ces modèles sont intéressants car ils prennent en compte la complexité de la structure intestinale. Cependant une des limites de cette approche *in vitro* est la possibilité de rupture ou de déplacement des couches cellulaires faussant ainsi le passage des nanoparticules.

Ces modèles sont mis en présence de nanoparticules de TiO_2 sous forme cristalline (anatase, 25 nm). La translocation possible à travers la barrière biologique est déterminée par microscopie électronique à transmission, une cartographie élémentaire par µXRF couplée à une analyse de l'environnement atomique du titane par spectrométrie d'absorption des rayons X.

Les résultats de cette étude montrent une faible accumulation de TiO_2 au niveau des cellules Caco2 ainsi qu'une absence de leur translocation ; une accumulation importante de nanoparticules au sein de la co-culture Caco2/HT29MTX avec une absence de translocation ; une accumulation importante et la mise en évidence d'une translocation pour la co-culture Caco2/RajiB.

La translocation des nanoparticules à travers le système digestif se ferait majoritairement en partie terminale de l'iléon c'est-à-dire au niveau des plaques de Peyer (jonctions intercellulaires). Ces plaques sont composées de 10 % de cellules M (61). L'absorption des nanoparticules par ces cellules représentent une voie potentielle après passage par le système lymphatique pour rejoindre les systèmes sanguins et les autres organes. D'autres hypothèses sont émises sur l'absorption des

nanoparticules et concernent le passage à travers l'épithélium intestinal par voie paracellulaire voire transcellulaire (figure 11) (46,63).

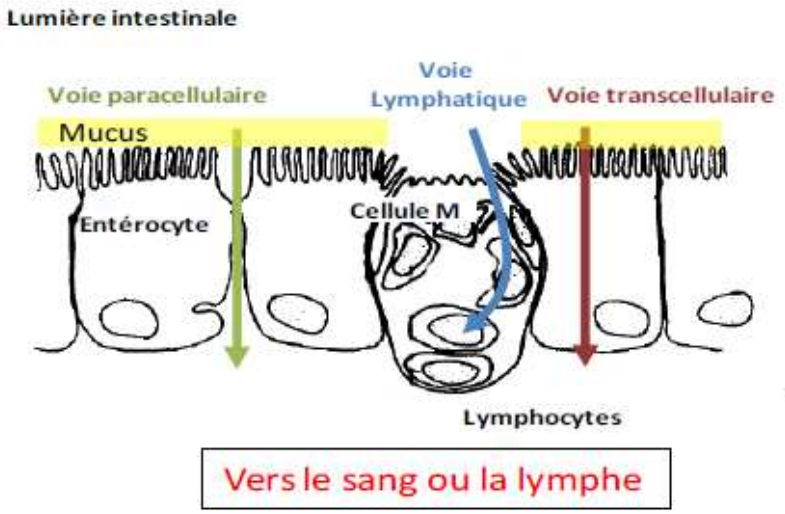

Figure 11 *extraite* **(4)** *: Passage des nanoparticules à travers l'épithélium intestinal.* **Trois voies sont suspectées : voie lymphatique, la plus documentée (absorption par les cellules M), la voie paracellulaire (passage entre deux cellules), et la voie transcellulaire (absorption par les entérocytes, spécialisés dans l'absorption de nutriments)** (63)**.**

L'analyse du passage du franchissement de l'épithélium intestinal par les nanoparticules prend tout son sens si l'on considère que l'abdomen constitue un « second cerveau » présentant 200 millions de neurones. En effet, son rôle clé dans le développement de nombreuses pathologies chroniques (dépression, anxiété, maladies neuro-dégénératives) commence seulement à être appréhendé. De plus, des inquiétudes sont soulevées par la présence de nanoparticules dans les laits maternisés et de leur éventuel passage à travers la barrière intestinale.

III. Toxicocinétique des nanoparticules après pénétration dans l'organisme.

Afin de mettre en évidence une éventuelle toxicité des nanoparticules, il est nécessaire de déterminer le devenir de ces éléments dans l'organisme, c'est-à-dire leur cinétique. La cinétique regroupe l'ensemble du processus ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion).

Dans un premier temps la substance (médicament ou toxique) est absorbée. Cela correspond à son passage dans la circulation sanguine. Elle est ensuite distribuée aux différents organes et peut subir un métabolisme (ou biotransformation) au niveau du foie. Enfin elle peut être éliminée de l'organisme par voie rénale, biliaire ou fécale.

Pour les substances chimiques « classiques », la toxicocinétique peut être prédite par comparaison avec des analogues structuraux. En revanche, pour les nanoparticules, trop peu de données sont disponibles et une étude au cas par cas serait nécessaire afin de déterminer leur devenir dans l'organisme, chaque nanoparticule engendrant des effets différents.
Cependant quelques hypothèses peuvent être émises (20).

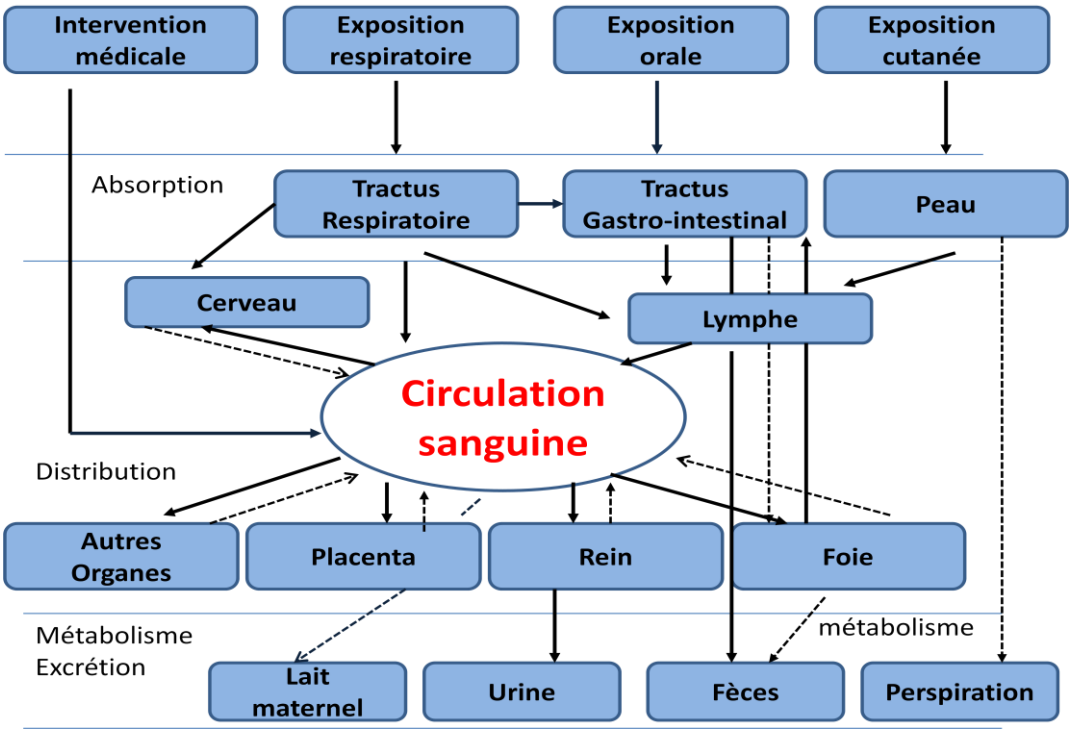

Figure 12 : Cinétique des nanoparticules. Le processus ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) est représenté. Les flèches pleines représentent les hypothèses confirmées concernant les voies empruntées par les nanoparticules ; les flèches pointillées les voies non démontrées (20)**.**

La principale voie d'exposition aux nanoparticules est la voie pulmonaire en raison de la grande quantité de nanoparticules présentes dans l'environnement. Cependant, du fait de l'essor des nanoparticules dans les domaines de la cosmétique, de l'alimentaire et du médical, les voies cutanée, gastro-intestinale et parentérale ne doivent pas être négligées.

L'absorption est la première étape de la cinétique. Concernant la voie pulmonaire, ce passage se fera principalement au niveau des alvéoles pulmonaires, système richement vascularisé. Les nanoparticules présentes dans le tractus gastro-intestinal peuvent quant à elles atteindre la circulation sanguine ou lymphatique par les entérocytes ou les plaques de Peyers.

La deuxième étape de la cinétique est la distribution de ces nanoparticules aux différents tissus ou

organes (foie, rate, cœur, cerveau). Lorsque les nanoparticules atteignent la circulation générale, elles peuvent interagir avec les protéines plasmatiques, les facteurs de coagulation, les globules blancs ou les globules rouges.

Le métabolisme à présent, concerne les nanoparticules absorbées au niveau du système gastro-intestinal qui rejoignent le foie (organe de la métabolisation) par la veine porte. Cependant peu de résultats sont à ce jour disponibles sur ce point.

L'élimination des nanoparticules s'effectue ensuite par différentes voies : soit par leur « porte d'entrée » si celles-ci ne sont pas absorbées (escalator mucocilliaire pour la voie pulmonaire) ; soit par voie rénale ou biliaire pour les nanoparticules ayant gagné la circulation générale.

La cible rénale doit faire l'objet d'une attention particulière, le rein intervenant majoritairement dans le processus d'élimination des nanoparticules (64). Il est donc nécessaire de s'interroger sur l'impact de la présence de nanoparticules au niveau de cet organe d'élimination. Des études *in vitro* ont ainsi été réalisées (Laboratoire de biologie cellulaire, Faculté de sciences biologiques de Bordeaux) sur des lignées cellulaires humaines issues de la partie glomérulaire (lieu de filtration) et tubulaire proximale (lieu de réabsorption et d'accumulation) des néphrons (65). Une exposition limitée (24 heures) des cellules rénales aux nanoparticules met en évidence l'influence de leurs caractéristiques physico-chimiques sur les effets biologiques alors qu'une exposition prolongée (28 jours) permet d'évaluer l'impact de la durée d'exposition sur les effets toxicologiques des nanoparticules.

La composition chimique et la libération de cations par les nanoparticules apparaissent comme des paramètres essentiels à l'origine d'effets cytotoxiques sur les cellules rénales.

L'étude porte sur trois nanoparticules métalliques : le dioxyde de titane (TiO_2), l'oxyde de zinc (ZnO) et le sulfure de cadmium (CdS).

Les nanoparticules non dissociables de TiO_2 n'apparaissent pas comme toxiques à court terme, à la différence des nanoparticules de ZnO et CdS, susceptibles d'engendrer des effets cytotoxiques part la libération de cations (Zn^{2+}, Cd^{2+}). De plus, l'augmentation de la surface des particules atteignant la taille nanométrique améliore leur capacité de dissociation.

Les nanoparticules de TiO_2, après expositions répétées, forment des agglomérats pouvant être internalisés dans les cellules par des mécanismes encore inconnus et s'accumulent dans le territoire cytoplasmique (vacuoles) les rendant potentiellement toxiques sur des temps plus longs d'exposition.

Une corrélation directe entre formation d'espèces réactives oxydées (ERO) et effets cytotoxiques a pu être établie pour la double cible tubulaire et glomérulaire. Des ERO sont générées de façon indirecte par les cations métalliques libérés par dissociation des nanoparticules. Ces ERO sont suffisantes pour induire un stress oxydant et l'apparition de dommages cellulaires (peroxydation lipidique, atteinte de la membrane lysosomale), ainsi qu'une réponse adaptative moléculaire (réponse anti-oxydante, réponse au stress cellulaire, apoptose : mort cellulaire programmée) sur une courte période d'exposition. Pour les nanoparticules de TiO_2, c'est à la suite d'une exposition longue et répétée que survient un stress oxydant à l'origine d'effets cytotoxiques *in vitro*.

L'analyse de l'impact des nanoparticules menée *in vitro* permet donc une approche toxicologique adaptée à la détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires.

Partie 4 : Etudes *in vitro* et *in vivo* de la pénétration cutanée et des effets sur la santé des nanoparticules de TiO_2 contenues dans les dermo-cosmétiques.

I. Données concernant l'exposition de la population générale aux cosmétiques contenant des nanoparticules.

La barrière cutanée protège le corps des atteintes environnementales. Alors que les molécules de faible poids pénètrent les couches cutanées vivantes de la peau, les particules plus grosses s'infiltrent généralement dans la couche cornée superficielle, sauf existence de microlésions.

Dans les pays industrialisés, les nanoparticules émises dans l'environnement (moteurs diesel, pigments), augmentent les risques d'expositions internes par ingestion et inhalation. Le risque d'absorption percutanée des nanoparticules est également davantage pris en compte. En effet, les produits domestiques (produits d'entretien ménager) et dermo-cosmétiques (crèmes solaires, fond de teint, crèmes de soin, dentifrices, rouges à lèvres) utilisés, contiennent dans leurs formulations de nombreuses nanoparticules, le plus souvent sous forme de TiO_2, et sont directement appliqués sur la peau (20). Ces produits étant employés quotidiennement, l'exposition est quasi-permanente. De même, certains textiles tels que les vêtements de sport, les chaussettes, contiennent des nanoparticules d'argent à visée antibactérienne (45,66). Bien que la peau constitue naturellement une barrière protectrice, il faut émettre l'hypothèse que certains ingrédients puissent franchir cette barrière et se trouver dans la circulation générale.

De même, d'autres produits sous forme de « spray » susceptibles d'être inhalés, et l'usage de topiques cosmétiques sur les muqueuses, augmentent les possibilités de pénétration. C'est pourquoi il apparaît essentiel d'étudier les conséquences sur la santé de l'application de ces produits et de quantifier cette exposition.

Une première étude a été menée en 2006 aux Etats Unis sur 360 femmes, âgées de 18 à 69 ans utilisant régulièrement des cosmétiques (67). Les produits inclus dans l'étude se présentent sous

différentes formes. Il s'agit de nettoyants visage pouvant être rincés (liquide, gel, savon) ou sans rinçage (lotion, lait) ; de shampoings ou après shampoings sans rinçage ; de fards à paupière ou poudre.

Ces femmes ont dû rapporter la fréquence d'application de ces produits cosmétiques sur deux semaines.

Des analyses statistiques ont été conduites et l'échantillon de personnes choisies a été comparé à la population de femmes adultes des Etats-Unis afin que l'étude soit représentative (68).

Sur les 360 sujets recrutés, seuls 295, 297 et 299 ont complété respectivement l'étude pour les nettoyants visage, les produits de coiffure, et les fards à paupière.

Une étude similaire a été effectuée dans les mêmes conditions auprès de 360 femmes américaines âgées de 19 à 65 ans sur d'autres produits tels que parfums, laques, gels coiffants, fonds de teint liquides, shampoings, gels douches, et antiperspirants (69).

Le mode d'utilisation de chaque produit est différent. Par exemple, les nettoyants pour visage sont utilisés par chaque sujet tous les jours de l'étude voire deux fois par jour et les fards à paupière en moyenne une fois par jour avec une fréquence d'application moindre le week-end. La fréquence d'utilisation de soins capillaires est quant à elle plus aléatoire et dépend de la fréquence de lavage (67). Ces travaux mettent en évidence une consommation importante de dermo-cosmétiques susceptibles de contenir des nanoparticules, point de départ à l'étude de l'impact éventuel sur la santé des consommateurs des nanoparticules contenues dans les dermo-cosmétiques.

Produits cosmétiques	**Quantité moyenne de produit par application (en g)**	**Médiane de la quantité de produit par application (en g)**	**Quantité moyenne de produit appliqué par jour (en g)**	**Médiane de la quantité de produit par jour (en g)**	**Nombre d'applications par jour**
Nettoyant visage	2,57	2,11	4,06	3,25	1,6
Fard à paupière	0,03	0,09	0,04	0,010	1,2
Parfum	0,33	0,23	0,53	0,34	1,67
Laque	2,58	1,83	3,57	2,71	1,49
Gel coiffant	3,64	2,66	5,18	3,74	1,51
Fond de teint liquide	0,54	0,36	0,67	0,45	1,24
Shampoing	11,76	9,56	12,80	10,75	1,11
Gel douche	11,3	9,5	14,5	12,9	1,37
Anti-transpirant	0,61	0,45	0,79	0,59	1,3

Tableau 3 : Quantité moyenne et médiane de produit appliqué pour chaque type de cosmétiques par application, par jour ainsi que le nombre moyen d'applications par jour.

II. Mise en évidence du passage des nanoparticules contenues dans les dermo-cosmétiques au travers de la barrière cutanée et localisation cellulaire.

Les produits cosmétiques commercialisés contiennent dans leur formulation bon nombre de nanoparticules, notamment du dioxyde de titane (TiO_2) et de l'oxyde de zinc (ZnO), incorporés afin

d'améliorer entre autres la transparence et la tenue des produits. Le TiO_2 et le ZnO, sont également utilisés en tant que filtres anti-UV inorganiques (ou physiques) à large spectre, en raison leur capacité d'absorption et de réflexion des UV (48). Ces dermo-cosmétiques étant appliqués quotidiennement sur la peau, il paraît important de s'interroger sur la pénétration de ces nanoparticules au travers de la barrière cutanée, de leur accumulation dans l'organisme et de leur toxicité afin de déterminer l'impact de ces nanomatériaux sur la santé des consommateurs (70).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit en 2006 l'*absorption* cutanée comme le transport de substances chimiques depuis la surface de la peau jusqu'à la circulation générale alors que la pénétration cutanée représente l'entrée de substances au sein de la couche cornée.

Les nanoparticules manufacturées utilisées par l'industrie dermo-cosmétique peuvent être divisées en deux catégories : les produits biodégradables (liposomes, émulsions) et les non biodégradables (oxydes métalliques sous forme de fullerènes). La toxicité concernerait essentiellement les monomères et les métabolites des nanomatériaux (70).

Il est complexe d'évaluer le passage de la barrière cutanée des nanoparticules contenues dans les dermo-cosmétiques. En effet, la pénétration des nanoparticules dans les tissus vivants n'a pas été clairement déterminée : de nombreuses études ont été réalisées sur des modèles *in vitro* mais peu d'entres elles concernent des modèles *in vivo*. De plus, la plupart des études ont été réalisées sur des temps courts, avec des particules non caractérisées selon les connaissances actuelles en termes de taille, forme cristalline, enrobage, etc.

Différentes méthodes d'analyses ont été utilisées pour la détection du titane par exemple : analyse X en dispersion d'énergie, spectrométrie d'absorption atomique, microscopie électronique.

Dans ce cadre, « NANODERM », projet européen auquel a participé le Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan (CENBG), travaille depuis plusieurs années sur les problématiques liées à la pénétration de la barrière physiologique cutanée suite à l'application de topiques pharmacologiques et dermo-cosmétiques. Ce projet est basé sur la microanalyse d'échantillons biologiques, qui a pour objectif la quantification, la détection et le traçage des nanoparticules de TiO_2 après application de crèmes solaires du commerce sur des échantillons de peau porcine et humaine. Plusieurs techniques d'analyses de haute résolution comme la Microscopie Electronique à Transmission (MET) et la STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy) sont exploitées. La technique STIM révèle l'ultra-structure du tissu étudié grâce au contraste en densité naturelle de l'échantillon. La méthode PIXE (Particle induced X-Ray emission) permet une cartographie élémentaire chimique rapide et sensible (limite de détection de l'ordre de la partie par million). Enfin, la technique de diffusion RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry) détermine la masse de la matière organique des échantillons étudiés. La combinaison des informations fournies par les méthodes PIXE et RBS permet une mesure très précise des concentrations d'éléments traces dans les tissus ou cellules.

L'analyse des échantillons par techniques STIM et PIXE met en évidence une répartition du TiO_2 à l'intérieur des follicules pileux (de façon non homogène) et au niveau des couches externes de la *stratum corneum* (71)

Une étude de la FDA (*Food and Drug Administration* ; Sadrieh *et al.*) peut s'avérer pertinente. Des expériences ont été menées *in vivo* en vue de l'évaluation de la pénétration cutanée de nanoparticules de TiO_2 représentatives de celles commercialisées pour les produits cosmétiques. Elles ont est menées sur le mini-porc, espèce qui constitue un modèle approprié pour l'extrapolation des résultats à l'homme en raison des fortes similarités de la peau entre ces deux espèces en termes de perméabilité et de structure cutanées. Ce travail a été réalisé sur une durée relativement longue

avec des applications répétées (application de produits 4 fois par jour, 5 jours par semaine durant 22 jours).

Ainsi, Sadrieh *et al.* mettent en évidence par microscopie électronique à balayage la présence de fortes quantités de nanoparticules de TiO_2 (enrobées et non enrobées) et de particules de TiO_2 submicroniques (300-500 nm) dans le *stratum corneum* et la présence de quelques particules isolées de TiO_2 dans le derme pour les animaux traités avec les trois types de particules. Pour ce point, les auteurs émettent l'hypothèse d'une mauvaise séparation de l'épiderme et du derme entraînant la présence de TiO_2 dans le derme. Par ailleurs, cette étude révèle des quantités statistiquement significatives de TiO_2 dans le ganglion inguinal gauche du groupe traité par des nanoparticules de TiO_2 non enrobées (forme la plus rencontrée dans les cosmétiques) et dans le ganglion inguinal droit du groupe traité par des particules de TiO_2 submicroniques (300-500 nm).

Ces résultats ne permettent pas de conclure de façon définitive à une absence d'absorption systémique chez le mini-porc du fait de la présence de nanoparticules de TiO_2 non enrobées et de particules de TiO_2 submicroniques (300-500 nm) dans les ganglions inguinaux. Les auteurs ne concluent pas sur la présence statistiquement significative de TiO_2 dans les ganglions inguinaux ni sur une diffusion systémique potentielle. (72).

Les expériences *in vivo* chez l'animal et en particulier chez le porc constitue un outil indispensable à l'obtention de données pertinentes à l'extrapolation à l'homme. Néanmoins, seules des études sur l'homme permettraient de certifier la pénétration cutanée des nanoparticules.

Certaines expériences pilotes réalisées *in vivo* sur un nombre restreint d'individus mettent en évidence, par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (méthode d'analyse qualitative et quantitative de sensibilité importante), après exérèse chirurgicale du tissu cutané, la présence d'un taux élevé de TiO_2 dans l'épiderme et le derme suite à une application excessive de

crème solaire (73) alors que d'autres travaux prouvent que le TiO_2 et le ZnO sous forme micro et nano-particulaire sont incapables de pénétrer dans l'épiderme (74). Ces études ne prennent pas en compte des paramètres tels que les mouvements de la peau, l'état des follicules pileux, la charge des particules ou encore l'âge du sujet (20). Par ailleurs Gulson et *al*. rapportent une augmentation du taux zinc dans le sang et les urines après application de crème solaire contenant des nanoparticules de ZnO chez une vingtaine d'individus dans des conditions normales d'applications et d'exposition solaire. Cependant, il est difficile de déterminer si le Zinc (Zn) présent dans les urines provient des nanoparticules de ZnO ou des ions Zn^{2+} dissous ayant pénétré par d'autre voies (75).

D'autres observations ont été réalisées par microscopie à rayons X après application de crème solaire du commerce sur peau d'oreille de porc (modèle considéré comme présentant des caractéristiques d'intérêt pour l'étude de la fonction « barrière cutanée » en réponse à des stress physiques ou chimiques (54)) et de rats anesthésiés après délamination de la couche cornée (« tape stripping »). Les résultats sont en accord avec ceux énoncés dans le rapport final de 2007 du projet « NANODERM » et montrent que le TiO_2 utilisé comme filtre anti-UV est en général visualisé en grande concentration dans les couches les plus externes de la couche cornée. Ces nanoparticules semblent se distribuer au niveau des follicules pileux et des stries de la peau (figure n°13) mais de répartition différente s'agissant de follicules pileux « ouverts » ou de follicules pileux « fermés » (76).

Figure 13 : Coupe histologique montrant la pénétration d'une particule marquée par fluorescence à l'intérieur du follicule pileux. Image de microscopie électronique (76)**.**

Cependant, il demeure difficile d'affirmer le passage des nanoparticules au travers de la barrière cutanée en raison des larges manipulations des fragments de peau au cours des études.

Au vue des données actuelles, les particules de taille supérieure ou égale à 100 nm ne semblent pas capables de franchir une barrière cutanée intacte mais ces investigations se poursuivent pour les nanoparticules de taille inférieure à 100 nm (76)

Dans ce contexte, le Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan (CENBG) a participé au développement de nouvelles méthodes et outils d'analyses (analyse par faisceau d'ions à haute résolution, protocoles de préparation d'échantillons biologiques exposés aux nanoparticules). Cette thématique a permis la mise en place d'études fondamentales, d'une part de la barrière cutanée, et d'autre part, de l'interaction des nanoparticules avec des cellules épithéliales humaines telles que les kératinocytes.

Des études par analyse chimique par microsondes nucléaires ont été réalisées sur peau humaine

native issue de biopsie, puis sur peau reconstituée *in vitro* en vue de l'étude de la diffusion de substances exogènes (oxydes métalliques, nanoparticules) à travers la barrière cutanée.

Afin de déterminer la toxicité des nanoparticules de TiO_2, des nanoparticules fonctionnalisées à l'aide de molécules fluorescentes (Rhodamine, Fluorescéine) ont été élaborées. Les résultats mettent en évidence la localisation des nanoparticules de TiO_2 *in vitro* sur des populations cellulaires de kératinocytes. Les nanoparticules de TiO_2 se localisent exclusivement au niveau cytoplasmique en zone péri-nucléaire. En revanche un marquage spécifique de l'appareil de Golgi des cellules exposées au TiO_2 fonctionnalisées par un anticorps indique une co-localisation entre l'appareil de Golgi et les nanoparticules par microscopie confocale (54).

III. Facteurs influençant la pénétration des nanoparticules par voie cutanée.

Plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer le passage cutané des nanoparticules. Lademann *et al.* se sont concentrés sur l'éventuelle augmentation de la pénétration des nanoparticules en fonction de la *taille des follicules pileux* après étude du volume des follicules pileux de différents volontaires sur différentes parties du corps (77). Le volume folliculaire le plus élevé a été observé sur le front et le mollet, comparé au dos, thorax, bras, avant-bras ou cuisse. Le front regroupe une forte densité de petits follicules pileux (duvet), à la différence du mollet où il s'agit d'une faible densité de grands follicules pileux. Le volume des follicules pileux du cuir chevelu n'a pas été déterminé précisément dans cette étude mais est susceptible d'être encore plus important que le volume du front.

Des expériences réalisées *in vitro* par Kimura *et al*. à l'aide d'un modèle nano-particulaire marqué par fluorescence (Fluoresbrite®: modèle facilement détectable et non soluble) sur peau de rat « hairless », mettent en évidence l'effet barrière d'une peau intacte aux nanoparticules fluorescentes par microscopie confocale à balayage laser (MCBL). Cependant, la fluorescence observée

augmente de manière proportionnelle au diamètre de pores créé artificiellement par des aiguilles. La pénétration des nanoparticules serait donc étroitement corrélée au diamètre des pores, à la taille des follicules pileux et à l'état de la peau. *L'intégrité de la peau* influence donc très certainement la pénétration des nanoparticules suite à leur application au travers de produits cosmétiques (70).

Autre paramètre à prendre en considération, l'influence de *la taille des particules* sur la pénétration cutanée (76). La taille des particules retrouvées dans les follicules pileux après application de crèmes solaires est de l'ordre de 100 nm (78). De plus, l'étude de la pénétration dans les follicules pileux de particules (diamètre compris entre 750 et 6000 nm) marquées par fluorescence sur des coupes histologiques montrent que les particules de diamètre inférieur pénètrent beaucoup plus facilement dans le follicule pileux que celles de taille plus importante (78). Le stockage des particules au sein des follicules pileux apparaît donc comme inversement proportionnel à la taille de celles-ci. La taille des particules pénétrant le follicule pileux est comprise autour de 300-600 nm, ce qui correspond approximativement à la taille des cuticules des poils (530 nm pour l'homme, 320 nm pour le porc) (76). Cependant, les résultats des études « NANODERM » réfutent cette hypothèse car les nanoparticules se retrouvant dans le follicule pileux étaient de taille inférieure (20-100 nm) (71).

Il apparaît même possible, après expérience *in vitro* sur peau d'oreille de porc, que la variation de la taille des particules permette le ciblage spécifique de différents sites folliculaires (79).

Aussi, Lademann *et al*. rapportent une augmentation de la pénétration de nanoparticules fluorescentes *in vitro* lorsque les cosmétiques sont appliqués en massage sur de la peau d'oreille de porc (80). Le mécanisme de pénétration des nanoparticules s'effectue par processus mécanique et non par diffusion passive (71). L*e massage* semble reproduire les mouvements physiologiques des poils *in vivo*, les mouvements des poils entrainant les nanoparticules au sein du follicule pileux. Après leur pénétration, les nanoparticules sont piégées à l'intérieur du follicule pileux et ne sont éliminées que par des processus lents tels que la croissance du poil ou l'afflux de sébum (79).

Les follicules pileux représentent une interruption au sein de la barrière cutanée et peuvent se comporter comme une « porte d'entrée » pour les nanoparticules dans certaines conditions (pratiques hygiéniques comme le rasage ou l'épilation). L'usage de topiques cosmétiques pourrait être à l'origine d'un éventuel passage de ces éléments dans la circulation sanguine.

IV. Effets toxiques potentiels des nanoparticules manufacturées utilisées en dermo-cosmétique : l'exemple du TiO_2

1. Les pathologies de la peau

1.1. La dermatite atopique

L'incidence de la dermatite atopique ou eczéma atopique est en constante augmentation (81), elle touche près de 20% des enfants de moins de 11 ans, et apparaît le plus souvent entre 2 et 6 mois. Cette pathologie concerne également 5% des adultes (82). La dermatite atopique peut se définir comme une affection inflammatoire de la peau avec une hyperréactivité cutanée due à des facteurs déclencheurs environnementaux. Il s'agit d'une pathologie chronique, d'évolution longue avec disparitions et réapparitions possibles des symptômes. Elle est sans gravité, non contagieuse et disparaît généralement avec l'âge. Cependant, elle est souvent ressentie comme une expérience douloureuse et pénible.

La dermatite atopique se caractérise par une xérose (sécheresse cutanée), du prurit et des lésions érythémateuses. Elle se limite essentiellement à la peau du visage et aux zones de flexions comme les coudes ou les aisselles, zones où l'épiderme est le plus fin. Il existe une prédisposition génétique à la dermatite atopique. En effet, elle survient sur un terrain familial allergique appelé atopie (82). Il est établi qu'un enfant sur deux dont les deux parents sont allergiques développe une dermatite

atopique (81).

Deux causes majeures sont responsables de la survenue de cette pathologie. D'une part, la fonction barrière de la peau peut être défaillante, rendant la peau plus perméable. La perte en eau est alors augmentée (sécheresse de la peau) et les agresseurs (allergènes) pénètrent plus facilement. D'autre part, il peut se produire une réponse immunitaire exagérée suite à la présence d'un allergène et provoquer ainsi une poussée d'eczéma qui se traduira par une rougeur, des démangeaisons, voire un suintement. Chez 80% des individus atteints de dermatite atopique, une augmentation sérique en Immunoglobulines E (IgE) est observée (81).

De multiples facteurs favorisent les crises : des facteurs saisonniers ou climatiques (hiver, froid) ; des allergènes aériens (pollens), de contact (nickel...), alimentaires ; des infections (otites, rhumes, poussées dentaires...) ; des irritations cutanées (produits cosmétiques) ; des facteurs psychologiques (stress, émotions).

Le traitement préventif consiste à restaurer la fonction barrière de la peau (crèmes, huiles de bain...) et à limiter voire éviter le contact avec les allergènes. Pendant la crise, le traitement repose sur la prescription de dermo-corticoïdes et/ou immunosuppresseurs locaux.

1.2. Cancers cutanés

Le cancer de la peau est une tumeur maligne développée aux dépens des cellules de la peau. Les cancers de la peau existent sous trois formes : les carcinomes basocellulaires, les carcinomes de cellules squameuses et les mélanomes.

Les cancers de la peau sont les cancers les plus fréquents, mais aussi les plus guérissables s'ils sont détectés et traités assez tôt. Aux Etats-Unis, un million de nouveaux cas de carcinomes (basocellulaire et des cellules squameuses) sont détectés chaque année et l'incidence des

mélanomes ne cesse de s'accroître. Cette progression est principalement la conséquence d'une surexposition aux rayons ultraviolets naturels et artificiels (83).

Il existe deux types de tumeurs cutanées. Les carcinomes se développant à partir de cellules de l'épiderme, soit de la couche basale (carcinome basocellulaire), soit des couches supérieures (carcinome spinocellulaire). Ce sont les plus fréquents, puisqu'ils représentent 90 % des cancers de la peau, dont 75 % pour les basocellulaires et 20 % pour les spinocellulaires. Les carcinomes surviennent la plupart du temps après 50 ans et se guérissent aisément. Les carcinomes basocellulaires ne développent jamais de métastases ; les spinocellulaires assez rarement, principalement dans les ganglions lymphatiques proches de la tumeur (54).

Chez des sujets prédisposés, plusieurs facteurs environnementaux, et plus particulièrement des expositions solaires aiguës intermittentes et répétées, sont impliqués dans la formation des carcinomes basocellulaires.
Cependant parmi les facteurs de risque essentiels, les prédispositions génétiques ne doivent pas être exclues, de même que l'exposition à certains agents pathogènes (virus du papillome humain), les cicatrices de brûlures et les plaies persistantes.

Les mélanomes se développent à partir de mélanocytes, lieu de synthèse de la mélanine. Cette mélanine est responsable d'une pigmentation brune ou rouge. La pigmentation brune confère le bronzage et une certaine protection contre les rayonnements ultraviolets alors que la pigmentation rouge n'assure aucune protection. Les sujets qui fabriquent essentiellement des pigments rouges ne bronzent pas et ont, de ce fait, plus de risque de développer des cancers cutanés. Les mélanocytes sont normalement présents dans l'épiderme, associés aux cellules épidermiques localisées en partie profonde de l'épiderme.

Ces cancers sont beaucoup plus rares, mais peuvent se développer chez de jeunes sujets. Il faut les détecter et les traiter rapidement, car ils peuvent engendrer des métastases très difficiles à éradiquer. Le plus souvent, les mélanomes sont des tumeurs pigmentées, plus ou moins brunes (contenant la mélanine).

L'exposition solaire excessive est le facteur essentiel responsable du développement des cancers cutanés, et plus particulièrement des mélanomes. Les patients à peau blanche d'origine européenne sont les principales victimes des carcinomes cutanés, qui sont plus rares chez les patients à peau pigmentée. Cependant, l'exposition excessive aux rayons solaires n'est pas le seul facteur contribuant au développement de cancers cutanés, certaines caractéristiques génétiques engendrent une prédisposition au mélanome (54).

La polémique des produits dermo-cosmétiques

De nombreuses substances composant les produits cosmétiques appliqués de manière répétitive sur la peau sont suspectées favoriser l'apparition de ces cancers. En effet, selon les estimations, le nombre de cancers de la peau progresse régulièrement avec deux fois plus de cancers tous les dix ans, ces données étant contradictoires avec l'augmentation de la consommation de produits solaires, multipliée par deux en dix ans (d'après la Fédération des industries de la parfumerie). Depuis plusieurs années maintenant, une polémique se développe et concerne la toxicité potentielle de certaines molécules contenues dans des produits cosmétiques à usage courant. Parmi les composés incriminés on retrouve : des conservateurs tels que le phénoxyéthanol, le méthylisothiazolinone (MIT) ou les parabènes, certains filtres UV- notamment le 4-méthyl-benzylidène camphor (4-MBC) - possédant des effets perturbateurs endocriniens- ainsi que les nanoparticules de TiO_2 présentes dans de nombreux produits cosmétiques (crèmes solaires, dentifrice…) (1). Certaines études

mettent en évidence des effets indésirables sur la santé des composés contenus dans les crèmes solaires suite à de fortes doses d'exposition. Cependant, les effets de ces composés à doses plus faibles, notamment au travers d'une exposition via les dermo-cosmétiques n'est toujours pas prouvée.

Plusieurs hypothèses sont avancées mais la communauté scientifique reste divisée sur le sujet. Par exemple, les individus s'enduiraient d'une mince pellicule de crème solaire et, se croyant protégés, ne respecteraient pas ainsi le mode et la fréquence d'application des produits.

Il se peut également que l'augmentation actuellement observée des cancers de la peau puisse s'expliquer par un « effet retard ». En effet, 20 à 30 ans peuvent s'écouler entre le moment où un individu initie le développement d'un cancer de la peau et le moment où la pathologie se déclare et est diagnostiquée. Il se pourrait donc que des mélanomes apparaissant dans les années 1990 trouvent leur origine dans les années 1970, et probablement avant.

Les français notamment, n'ont réellement pris en compte le risque de l'exposition solaire qu'à partir des années 1990 avec la mise en œuvre de la prévention et l'utilisation de la crème solaire. Aussi, le nombre des cancers de la peau en France devrait continuer de croître avec 6 000 à 7 000 nouveaux mélanomes par an. En revanche, en Australie, une diminution du nombre de cancers serait observée seulement depuis 4 ans, bien que leur campagne de prévention ait été engagée il y a maintenant plus de 25 ans.

A ce jour, aucune étude scientifique ne peut ni prouver ni valider ces tendances (54).

2. Etat des connaissances sur la toxicité des nanoparticules de TiO_2 contenues dans les dermo-cosmétiques

Très peu de données fiables (car non reproduites) sont actuellement disponibles concernant l'impact des nanoparticules manufacturées (contenues dans les dermo-cosmétiques entre autres) sur la santé de l'homme.

L'étude des effets toxicologiques des nanomatériaux a débuté ces dernières années sur des modèles animaux *(in vivo)* et des cellules en culture *(in vitro)*. De plus les éléments de nanotoxicologie rapportés chez l'homme font état d'interactions des nanoparticules avec le vivant au niveau cellulaire et incitent donc la prudence.

2.1. Stress oxydatif

D'importantes données provenant d'expériences réalisées sur les particules ultrafines de la pollution atmosphérique et quelques études effectuées sur des nanoparticules manufacturées suggèrent que le stress oxydant constitue un mécanisme central dans les effets toxicologiques des nanoparticules manufacturées (53,84,85). Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre de la balance oxydants – antioxydants en faveur des oxydants. Ce déséquilibre survient quand la production d'oxydants (espèces réactives oxygénées : ERO), est supérieure à la capacité des systèmes antioxydants de l'organisme (enzymes tels que la superoxyde dismutase, la catalase ou encore les vitamines C et E). Une diminution de la capacité de systèmes antioxydants, avec une formation d'oxydants inchangée, peut également conduire au stress oxydant. La production accrue d'ERO endommage les macromolécules biologiques (acides nucléiques, lipides, protéines) perturbant ainsi le fonctionnement cellulaire (hyper prolifération, apoptose, mutation) (2). Ces phénomènes de stress oxydant interviennent dans de nombreuses pathologies (athérosclérose, maladies neurodégénératives, cancers…) et dans les processus de vieillissement cellulaire. Ainsi, une action délétère du stress oxydatif sur l'ADN et l'ARN cellulaire accompagnée d'inactivation enzymatique

peut être suspectée au niveau de la peau.

Deux mécanismes majeurs aboutissent à un stress oxydant après exposition aux nanoparticules : premièrement, une production d'espèces réactives oxygénées (ERO) par la nanoparticule elle-même du fait de ses propriétés physico-chimiques comme la réactivité de surface et la présence de métaux de transition ; deuxièmement, une production accrue d'ERO par la cellule suite au contact et/ou à l'incorporation de nanoparticules (85).

Des expériences ont été menées *in vitro* par Jaeger *et al*. sur des kératinocytes HaCaT (HaCaT = human adult low calcium, high temperature keratinocytes).
Les cellules HaCaT constituent un modèle cellulaire utilisé en recherche scientifique et dermo-cosmétique. Ces cellules non cancéreuses issues d'une lignée cellulaire de kératinocytes humains conservent une forte capacité de prolifération et de différenciation *in vitro* (caractère immortel). Ces cellules offrent également des capacités de régénération tissulaire *in vitro* ("tissu *in vitro*") et de transformation tumorigène.

Les résultats de l'équipe allemande mettent en évidence la survenue de mutations au niveau de l'ADN mitochondrial après internalisation et agrégation de nanoparticules de TiO_2 par les cellules HaCaT. La délétion observée, (perte de la paire de base 4977 appelée « common deletion »), est la plus fréquente et la plus caractéristique des mutations de l'ADN mitochondrial humain. Elle est induite par la présence de grande quantité d'ERO. Les nanoparticules de TiO_2 sont donc à l'origine d'une augmentation du taux d'ERO semblable à une exposition importante aux UVA. Cette production d'ERO peut donc être à l'origine d'un éventuel effet cytotoxique (mort cellulaire) ou génotoxique induit par les nanoparticules de TiO_2. Cependant, des expériences complémentaires sont indispensables afin de confirmer l'impact de l'usage quotidien de cosmétiques incluant des

nanoparticules sur la santé humaine. Ces études doivent entre autres prendre en compte les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, leur concentration et la durée d'exposition (86).

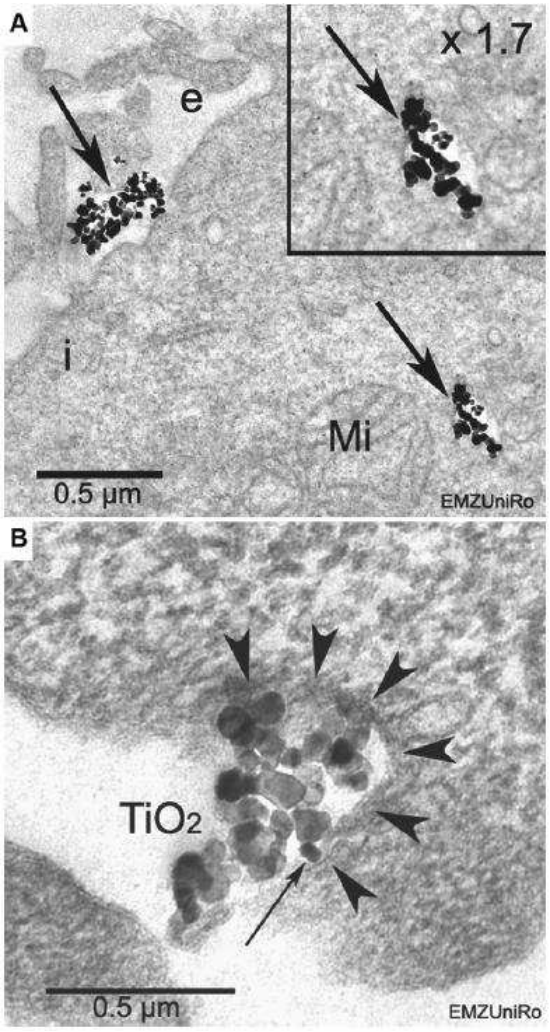

Figure 14 : Images obtenues par microscopie électronique à transmission des kératinocytes après traitement par TiO_2. (A) : détection d'agglomérats de TiO_2 dans l'espace extracellulaire dans une vésicule d'endocytose (e) et intracellulaire (i). (B) représente l'invagination de la membrane cellulaire précédent l'étape d'endocytose (86)**.**

Les nanoparticules de TiO_2 possèdent par ailleurs des propriétés photo-catalytiques potentialisées par les rayonnements UV. Cette propriété particulière peut s'avérer intéressante en photothérapie anticancéreuse (limitation de la croissance tumorale, apoptose des cellules cancéreuses). Les processus de photo-oxydation catalysée par le TiO_2 on été démontrés *in vitro.* L'action conjointe du

TiO_2 contenu dans les crèmes solaires et des UVA liée à l'exposition solaire est susceptible d'aggraver les dysfonctions de la barrière cutanée par production d'un stress oxydatif à l'origine de dommages au niveau de l'ADN cellulaire (49,87).

Aussi, l'équipe chinoise de Tu *et al*. met en évidence à plusieurs reprises une photo-toxicité dose-dépendante du TiO_2 en présence de nitrites.

Les structures et fonctions des protéines tyrosines peuvent être altérées par nitration (due à la présence d'espèces réactives au nitrogène) entrainant des anomalies au niveau des signaux de transduction cellulaire. Ce même phénomène peut être observé en cas d'inflammation ou de brûlures. Les nitrites sont présents dans les fluides biologiques comme la sueur ou le sang et en grande quantité dans les cosmétiques et l'alimentation.

Les risques liés à l'application de nanoparticules de TiO_2 en présence de nitrite sous irradiations UVA ont été évalués à l'aide de modèles cellulaires de kératinocytes humains (HaCaT). Les résultats mettent en évidence une augmentation de la toxicité des nanoparticules de TiO_2 de manière dose-dépendante et l'induction d'une nitration de la protéine cystatine A des cellules kératinocytaires amplifiant l'apoptose cellulaire.

D'une part, l'apoptose (mort cellulaire programmée) des kératinocytes est en lien avec la voie AIF (Apoptosis Inducting Factor), molécule pro-apoptotique libérée par la mitochondrie, qui fait suite à la production de monoxyde d'azote (NO).
D'autre part, les nitrites associés au TiO_2 augmentent considérablement la mort de cellules cutanées exposées aux UVA par production de radicaux libres nitrés inhibant l'activité de la protéine à cystatine A. Les caspases ne pouvant être inhibées par la cystatine A, il se produit une augmentation

de l'apoptose en raison de l'absence de régulation (88). Ces données sont rassemblées dans la figure suivante.

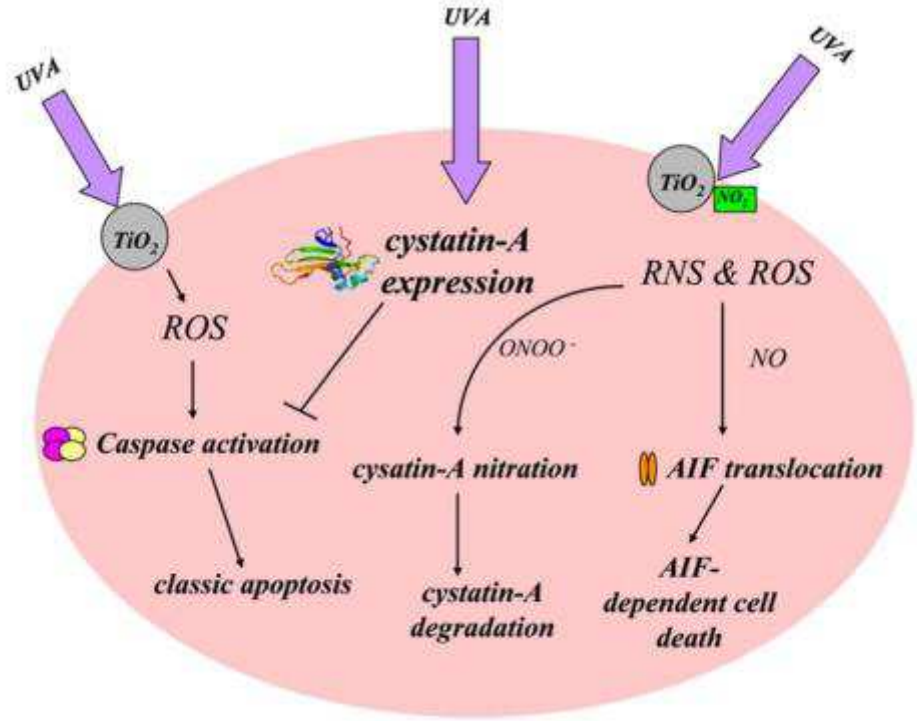

Figure 15 : Mécanisme décrivant les réponses intracellulaires aux radicaux oxygénés et azotés induits par des nitrites en présence de dioxyde de titane sous UV (88)**.**

Remarque : les nanoparticules de TiO_2 utilisées dans les produits cosmétiques sont enrobées par des substances organiques ou inorganiques et peuvent être également dopées, afin de diminuer les effets du stress oxydant. De plus, des systèmes antioxydants sont ajoutés dans les formulations. Concernant le TiO_2, la forme anatase est considérée comme susceptible de produire plus de stress photo-oxydant mais les produits cosmétiques ne contiennent généralement que le TiO_2 sous la forme rutile ou d'un mélange anatase/rutile.

2.2. Inflammation

L'inflammation est un phénomène se produisant en réponse à une agression menaçant l'organisme. Cette réponse est de type immunologique. L'inflammation est utile, car elle aide l'organisme à

combattre l'agression. Cependant, l'inflammation peut être exagérée, et alors devenir délétère. Les nanoparticules peuvent induire une réponse inflammatoire plus importante que celle induite par des particules de même forme et de même composition chimique, mais de taille micrométrique. Cette réponse inflammatoire est étroitement associée à la présence d'un stress oxydant activant les gènes pro-inflammatoires (85). La réaction inflammatoire s'atténue progressivement en cas d'intervention de mécanismes de contrôle (enzymes anti-oxydantes, médiateurs anti-inflammatoires) et aboutissent à une résolution spontanée de l'inflammation. Dans le cas contraire, la réaction inflammatoire peut entraîner la dysfonction de l'organe où elle se développe, et/ou affecter des organes à distance, à travers la sécrétion de médiateurs solubles.

Les nanoparticules de TiO_2 ne pénètrent pas facilement une barrière cutanée intacte. Cependant il est prouvé que la barrière cutanée de patients atopiques est altérée par le processus inflammatoire pouvant faciliter la pénétration des nanoparticules à travers la couche cornée.

Les nanoparticules de TiO_2 contenues dans les dermo-cosmétiques et produits pharmaceutiques sont essentiellement sous forme cristallines (anatases et rutiles), notamment dans les crèmes solaires (83). Ces cosmétiques sont en contact direct avec la couche cornée.

La dermatite atopique se traduisant par la présence de lésion inflammatoire cutanée, il semble intéressant d'étudier l'impact d'injection transdermique du TiO_2 sur la maladie. Pour cela, Yanagisawa *et al*. utilisent un modèle murin de peau atopique (souche de souris transgénique NC/Nga). L'injection d'un allergène, l'extrait de mite, mime les lésions de la dermatite atopique. Les résultats sont évalués en fonction de scores cliniques incluant l'état de sécheresse cutanée, la présence de blessures et d'œdèmes. L'administration intradermique d'une solution contenant les nanoparticules de TiO_2 de trois tailles différentes (15, 50 et 100 nm) n'entraine pas d'épaississement ou d'inflammation significative de la peau de l'oreille des souris transgéniques. L'injection d'allergènes d'acariens quant à elle, augmente significativement l'épaississement de la peau de

l'oreille en comparaison à l'injection de solution nano-particulaire après trois jours d'expérience. Enfin, l'administration conjointe de nanoparticules et d'allergènes augmente considérablement l'épaississement de la couche cornée. (89).

Après injection d'allergènes associés au TiO_2, il apparaît une augmentation de l'infiltration d'éosinophile par comparaison à l'injection d'allergènes seuls. Il en est de même pour les taux d'interleukines (IL4 ; IL5 ; IL13) alors que l'expression d'interférony (INFγ) au niveau cutané au contraire, diminue.

Ces résultats mettent également en évidence une augmentation significative du taux d'histamine suite à l'administration conjointe de nanoparticules et d'allergènes en comparaison à l'injection d'allergènes seuls (89).

L'injection intradermique de nanoparticules de TiO_2 semble aggraver les lésions de dermatite atopique supposant un dysfonctionnement de la barrière cutanée par des réponses inflammatoires, immunitaires Th2 et la libération d'histamine.

Par extrapolation, lorsque la barrière cutanée est franchie, le TiO_2 est donc susceptible d'aggraver les effets inflammatoires caractéristiques des allergènes cutanés dans la dermatite atopique.

L'exemple des adjuvants aluminiques met l'accent sur l'ambivalence des nanoparticules. Maquieira et al. confirment *in vivo* (étude chez la souris et le lapin) l'immunogénicité des nanoparticules d'oxydes d'aluminium. La liaison covalente de nanoparticules d'oxyde d'aluminium à un haptène (molécule de faible poids moléculaire antigénique (capable d'être reconnue par le système immunitaire) mais non immunogène) active une réponse spécifique du système immunitaire (90).

Cependant les données concernant le développement de myofascites à macrophages suite à l'injection de vaccins contenant des adjuvants aluminiques étoffent les résultats concernant le potentiel inflammatoire induit par les nanoparticules.

La myofascite à macrophages (MMF) est une maladie rare identifiée en 1993 et classée dans une nouvelle catégorie de syndromes nommée pour la première fois en 2011 sous le terme « Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants » (ASIA). La MMF est caractérisée par des manifestations systémiques (asthénie, myalgie, arthralgies, fièvre…) ou locales (au niveau du site d'injection du vaccin). Les causes spécifiques ne sont pas connues mais la maladie est le plus souvent associée à la persistance dans le muscle de l'oxyde d'aluminium utilisé comme adjuvant dans les vaccins humains chez des individus ayant une susceptibilité génétique. Au niveau du muscle, des lésions microscopiques montrent une infiltration de macrophages (91).

L'importance des études humaines sur l'absorption percutanée du TiO_2 est soulignée par l'insuffisance des expériences susceptibles de fournir une approche pertinente et applicable à l'évaluation du risque inflammatoire chez l'homme, les données disponibles concernant essentiellement des expositions suite à l'effraction de la barrière cutanée.

2.3.Perturbation de l'homéostasie ionique cellulaire

Des études *in vitro* (projet « NANODERM ») des effets du TiO_2 (anatase, 9 nm) sont menées sur différentes populations cellulaires : kératinocytes humains immortalisés (HaCaT), sébocytes humains immortalisés (SZ 95), fibroblastes murins immortalisés (NIH 3T3), culture primaire de fibroblastes humains (HDF), mélanocytes humains et cellules dendritiques humaines. L'analyse microscopique révèle : une internalisation au niveau cytoplasmique du TiO_2 dans les populations des fibroblastes, mélanocytes et cellules dendritiques par un phénomène d'endocytose ; une augmentation du calcium intracellulaire au niveau des fibroblastes ; une diminution de la prolifération des kératinocytes, sébocytes et fibroblastes. Après exposition au TiO_2, des changements morphologiques (rétractations, « trous ») sont décrits au niveau de la membrane cellulaire de fibroblastes humains (71).

En ce sens, des analyses par microfaisceau d'ions sur une culture de kératinocytes (*in vitro*) ont été menées au CENBG afin de déterminer si la composition chimique élémentaire des cellules cultivées en présence de TiO_2 (TiO_2- P25 : 80 % anatase, 20 % rutile de diamètre compris entre 25 et 35 nm) variait. L'analyse quantitative à l'échelle cellulaire ne révèle pas de modifications majeures dans la distribution et la composition chimique élémentaire pour la plupart des espèces chimiques étudiées. Indépendamment de la concentration en nanoparticules de TiO_2, il se produit cependant une augmentation significative de la concentration du calcium intracellulaire.

Il est défini et décrit qu'une augmentation de calcium intracellulaire induit la différenciation des kératinocytes et une modification du cytosquelette d'actine (92).

L'induction précoce de la différentiation des cellules exposées au TiO_2 a été mise en évidence par l'étude de l'expression de l'involucrine. L'involucrine est une protéine exprimée essentiellement dans les couches épineuse et granuleuse de l'épiderme et utilisée comme marqueur d'expression tardif de la différenciation des kératinocytes.

De plus, dans les cellules exposées au TiO_2, le réseau d'actine est très significativement modifié avec une organisation périphérique dans les cellules. Cette organisation est typique d'une réorganisation induite par une augmentation du calcium intracellulaire (93). Aussi, il a été constaté une diminution de la prolifération cellulaire non associée à une mort cellulaire.

La perturbation de l'homéostasie ionique par l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire s'accompagnant d'une différenciation cellulaire précoce significative avec diminution de la prolifération cellulaire (sans mort cellulaire) rend compte de la toxicité de ces nanoparticules (94).

2.4.Effets carcinogènes

Concernant le potentiel cancérigène des nanoparticules de TiO_2, différentes études révèlent des résultats contradictoires (95,96).

Certains auteurs affirment que les nanoparticules de TiO_2 contenues dans les dermo-cosmétiques ne traversent pas la couche cornée d'une peau saine et n'entrainent donc pas d'effets systémiques pour la santé humaine (5).

Bien que le titane et le TiO_2 soient considérés comme inertes à l'échelle micrométrique, il faut néanmoins s'assurer que ces constituants sont sans danger au vue de leur utilisation cosmétique sous forme nano-particulaire.

Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé en 2006 toutes les formes de TiO_2 comme potentiellement cancérigènes pour les hommes (classe 2B) sur les bases des données obtenues après étude de l'inhalation de particules finement divisées chez le rat et des données épidémiologiques chez l'homme, suggérant une augmentation de l'incidence des tumeurs et emphysèmes pulmonaires (2).

Une étude a été menée par Furukawa *et al*. afin de déterminer le potentiel promoteur de cancérogénèse cutanée des nanoparticules de TiO_2 fonctionnalisées ou non, utilisées en dermo-cosmétiques (95). L'expérience a été réalisée à partir de souris dont le processus de cancérogénèse cutané a été induit (par du 7,12 diméthylbenz[α]anthracène (DMBA)) et maintenu (par du 12-o-tétradécanoylphorbol 13 acétate (TPA)). La présence de nodules par observation macroscopique après application de nanoparticules de TiO_2 à doses croissantes n'est pas significative par comparaison aux groupes témoins. D'après ces résultats, l'application cutanée de nanoparticules de TiO_2 ne conduit pas à un risque de carcinogenèse cutanée.

Moon *et al.* étudient l'impact des nanoparticules de TiO_2 sur la croissance *in vivo* de tumeurs cutanées à travers la modulation de l'activité du système immunitaire (96). Le protocole consiste en l'injection intrapéritonéale quotidienne chez des souris de nanoparticules de TiO_2 pendant 28 jours précédant l'implantation de cellules tumorales (cellules de mélanome B16F10 utilisée pour l'analyse de la croissance tumorale *in situ*). Les données mettent en évidence une augmentation de la taille des tumeurs chez les souris exposées aux nanoparticules de TiO_2 par injection intra-péritonéale par comparaison aux souris « contrôles » (figure 16).

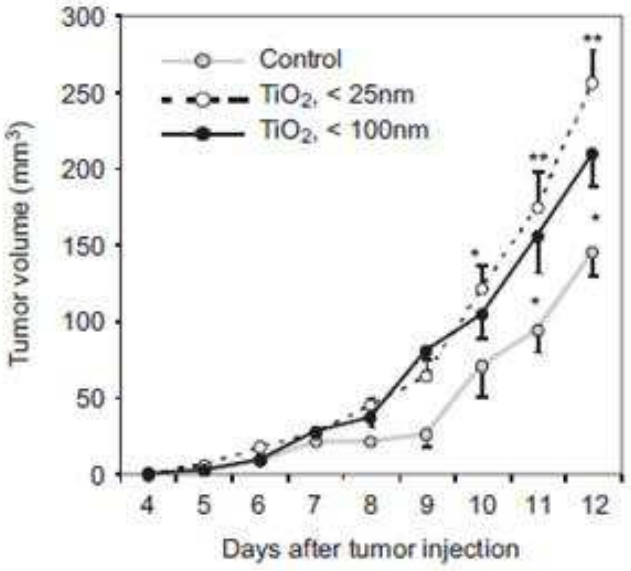

Figure 16 : Evolution de la taille des tumeurs après injection intrapéritonéale de TiO_2 (96)

L'expérience montre également que les nanoparticules de TiO_2 peuvent perturber le développement et la prolifération des lymphocytes B et T, diminuer la population de cellules Natural Killer (NK) ainsi que l'activité des macrophages.

Pour mémoire, les lymphocytes sont les cellules centrales du système immunitaire, capables de reconnaitre spécifiquement les éléments « étrangers » et de les différencier des composants de l'organisme. Normalement, ils ne doivent pas réagir contre les tissus de l'organisme lui-même. Il existe deux types de lymphocytes : les cellules B qui produisent les anticorps et les lymphocytes T

possédant plusieurs fonctions (assistent les cellules B dans leur réponse anticorps, reconnaissent et détruisent les cellules infectées, activent la phagocytose et contrôlent la qualité et le niveau de la réponse immune). Brièvement, les cellules Natural Killer (NK), sont quant à elles, capables de détruire une grande variété de cellules cibles. Elles représentent ainsi une seconde ligne de défense (97).

En se basant sur ces résultats, il est possible de suggérer que les nanoparticules de TiO_2 en altérant le système d'immunosurveillance ont un effet indirect sur la croissance tumorale *in situ*. La présence de nanoparticules de TiO_2 entraînerait donc une diminution de la réponse immunitaire et une augmentation de la taille des tumeurs solides comme le montre la figure n°16. Ces résultats sont en accord avec un précédent rapport indiquant que l'injection intrapéritonéale d'une suspension de TiO_2 sous forme de fullerènes peut potentialiser la croissance tumorale (cellules de mélanomes) *in vivo* par des mécanismes de suppressions de la réponse immune (98).

Conclusion et perspectives

Les nanoparticules font, à ce jour, partie intégrante de notre quotidien, puisque présentes en grande proportion dans nos produits de consommation courante et dans notre environnement. L'objectif de ce manuscrit est double : d'une part, informer des perspectives intéressantes et innovantes qu'offrent les nanomatériaux du fait de leurs propriétés physico-chimiques que ce soit dans les domaines de l'industrie ou du médical ; d'autre part, sensibiliser aux effets et interactions de ces éléments avec les systèmes biologiques.

En oncologie, le développement des nanoparticules permet aujourd'hui de proposer une thérapie ciblée, dont l'efficacité d'action et la diminution des effets secondaires sont supérieures à la chimiothérapie conventionnelle.

Ces thérapeutiques nouvelles se basent sur la capacité de délivrance et de ciblage ainsi que sur l'exploitation de caractéristiques propres aux nanoparticules. Dans ce contexte, certains produits sont d'ores et déjà en phase d'essais cliniques sur l'homme.

En imagerie, les nanoparticules inorganiques possèdent des caractéristiques d'absorption et de diffraction de la lumière qui les rendent intéressantes comme agent de contraste.

Le développement de nouveaux outils comme l'émergence de traceurs ou « bio-senseurs » fluorescents offre aujourd'hui l'espoir d'un diagnostic précoce et non invasif du cancer.

La maîtrise et l'essor de ces différentes applications en imagerie et thérapie donnent une nouvelle impulsion aux nanotechnologies et les orientent vers le développement de nanoparticules à fonctions multiples en vue de la vectorisation d'agents de contraste combinés à un nano-médicament.

Cette thèse d'exercice aborde la toxicité des nanoparticules contenues dans les dermo-cosmétiques

par le biais du TiO_2. Ces nanoparticules utilisées entre autres comme filtres physiques anti-UV dans les crèmes solaires et susceptibles du franchissement de la barrière cutanée, seraient suspectées d'engendrer une dynamique dans l'apparition et le développement de pathologies cutanées (cancers).

A travers l'analyse de différents travaux de recherche, une approche de cette nanotoxicité est proposée.

Plusieurs voies d'expositions aux nanoparticules sont possibles : la voie pulmonaire est la principale en raison des quantités importantes de particules ultrafines présentes dans l'environnement ; la voie digestive par l'ingestion de nanoparticules utilisées comme additifs alimentaires, excipients dans les formes pharmaceutiques orales, adjuvants dans les articles d'hygiène (dentifrice) ; enfin la voie cutanée est à considérer du fait de l'application quasi quotidienne de dermo-cosmétiques.

La nanotoxicité a essentiellement été étudiée *in vitro* par différentes techniques d'imagerie associées à des techniques de fonctionnalisation chimique des nanoparticules.

En admettant la voie transannexielle comme « porte d'entrée » à la pénétration transcutanée, il est envisageable dans certaines conditions (pratiques hygiéniques : rasage, épilation) que le TiO_2 puisse être en contact avec les cellules vivantes du follicule pileux. De même l'intégrité cutanée constitue un paramètre important dans le passage des nanoparticules.

Au niveau cellulaire, l'internalisation des nanoparticules de TiO_2 par les kératinocytes entraine une augmentation significative de la concentration calcique intracellulaire. Ce taux de calcium dans la cellule est associé à une diminution de la prolifération cellulaire en absence de mort cellulaire. L'internalisation des nanoparticules de TiO_2 provoque aussi une différentiation précoce des cellules

kératinocytaires.

Il a aussi été mis en évidence que la pénétration des nanoparticules peut induire un stress oxydatif à l'origine d'une toxicité cellulaire.

Enfin, si l'on considère que les nanoparticules de TiO_2 altèrent le système d'immunosurveillance, il n'est pas exclu qu'elles aient un effet indirect sur la croissance tumorale *in situ*.

A ce jour, il reste difficile de se prononcer quant à l'innocuité de ces éléments. D'autres travaux au cas par cas sont indispensables afin de clarifier leur impact sur la santé des hommes en raison de leur multiplicité et des différentes voies d'exposition possibles. L'étude du devenir des nanoparticules dans notre organisme (toxicocinétique) et de leurs effets cellulaires (stress oxydatif, cytotoxicité, génotoxicité) est essentielle afin de garantir leur sécurité d'utilisation.

D'autres points non évoqués dans ce manuscrit mériteraient de faire l'objet d'une attention particulière. Aujourd'hui se pose la question du devenir de ces composés nano-particulaires dans l'environnement. Des recherches se poursuivent sur l'impact de l'application de crème solaire avant la baignade et de l'effet de cette pollution sur les écosystèmes marins. Selon une étude de l'Environmental Health Perspectives (EHP), menée par le Professeur Donavaro, les crèmes solaires utilisées ont une action délétère sur les récifs coralliens. Des expériences menées dans différentes mers du globe (Océans Pacifique, Atlantique, Indien) soulignent que certains filtres anti-UV chimiques (ethylhexyl-methoxycinnamate (OMC), octocrylène (OCT), benzophenone-3 (BZ), ethylhexylsalicylate (EHS)) entraînent le blanchiment et la mort de coraux par développement d'infections virales détruisant la Zooxantelle, micro-algue vivant en symbiose avec le corail, nécessaire à son développement (99).

Une alternative afin de préserver l'écosystème marin serait l'utilisation de crèmes solaires avec filtres minéraux considérées comme « bio » mais contenant des nanoparticules.

En ce sens, une étude environnementale de l'impact de ces nanoparticules à l'aide d'un organisme multicellulaire se révèle pertinente.

De nouvelles expériences proposent une approche environnementale en laboratoire des effets potentiels des nanoparticules sur un organisme multicellulaire *Caenorhabditis elegans* (*C elegans)*, modèle animal de laboratoire admis pour réaliser des études toxicologiques *in vivo.*
La présence d'un stress induit par les polluants ou la désorganisation des écosystèmes peuvent être évaluées par l'analyse de l'abondance et de la structure des nématodes (vers ronds).

C. elegans est un modèle biologique très intéressant car il permet une première approche à l'échelle de la cellule. Il offre la possibilité d'étudier le passage des nanoparticules par différentes voies (ingestion, passage à travers la cuticule). De plus, les effets peuvent être observés au niveau de la cellule, des organes, mais aussi à l'échelle de l'individu (embryon, larve, adulte) et sur les générations successives.
Ce modèle permet également d'envisager des modes d'interactions plus complexes comme la bioaccumulation ou la bio persistance des nanoparticules.

Des tests de toxicité basés sur *C.elegans* ont été développés afin d'estimer les risques éco toxicologiques au niveau des sols et de l'eau. L'analyse élémentaire chimique par PIXE est une technique non invasive adaptée à la détection, localisation, suivi et quantification des nanoparticules dans cet organisme.

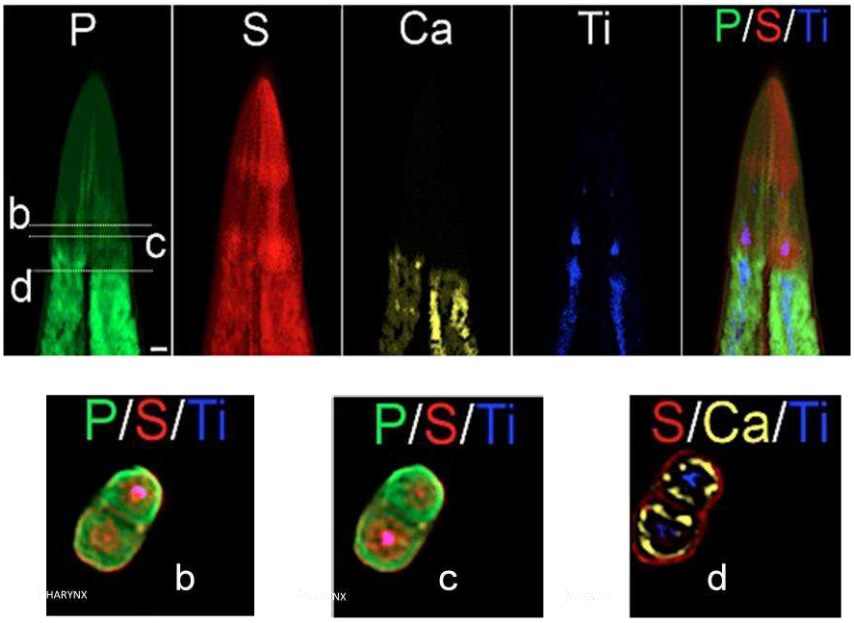

Figure 17 : Analyse PIXE-Tomographie (3D) de *C. elegans*. Distribution tissulaire des éléments chimiques (Phosphore, Soufre, Calcium). Détection et localisation des nanoparticules de TiO_2 (images CENBG)

Des études ont déjà démontré l'effet toxique et délétère des nanoparticules notamment sur les capacités reproductives de *C.elegans* (100). Par analogie à l'homme, *C.elegans* présentent anatomiquement les différents organes susceptibles d'être exposés aux nanoparticules avec des conditions d'expositions similaires. De plus, leur transparence permet un traçage facile des nanoparticules.

En conclusion, la nanotoxicologie nécessite une analyse au cas par cas, prenant en compte, la forme, la voie d'exposition, les vecteurs associés. Ce manuscrit témoigne que le domaine des nanotechnologies ainsi que leur impact environnemental et sur la santé humaine s'avèrent des sujets de recherche émergeant, puisqu'ils bouleversent le principe même de la toxicologie basée sur l'effet de la dose. .

Annexes

ANNEXE 1: Tableau récapitulant les méthodes de synthèse des nanomatériaux (inspiré du rapport AFSSET juillet 2006)

Méthode de production	Principe de fonctionnement	Type de nanomatériaux fabriqués	Taille des nanomatériaux
Méthodes physiques			
Evaporation /condensation sous pression inerte ou réactive	Evaporation d'un métal par chauffage puis condensation de la vapeur métallique afin d'obtenir des nano-poudres formées de particules nanométriques dispersées.	Fe, Ni, Co, Cu, Al, Pd et Pt. Oxydes.	20 à 100 nm
Pyrolyse LASER	Interaction en jets croisés entre l'émission d'un laser CO_2 et un flux de réactifs.	Si, SiC, SiCN, SiCNAlY, SiCO, Si_3N_4, TiC, TiO_2, fullerènes, suies carbonées, etc.	15 à 20 nm
Fluide supercritique (sans réaction chimique)	Le fluide supercritique peut être utilisé en tant que solvant, antisolvant, plastifiant, nébuliseur, phase d'émulsion, etc.	Matériaux pour la vectorisation de principes actifs	Quelques nm à quelques µm
Micro-ondes	Couplage avec les voies de synthèse des nanoparticules, pour permettre un chauffage	Nickel, argent	20 à 200 nm

	plus rapide et plus homogène du milieu.		
Irradiation ionique /Electronique	Plusieurs méthodes : dépôt d'énergie par des ions lourds rapides d'accélérateurs qui permet la réalisation de membranes polymères nanoporeuses ; irradiation de la mobilité ionique qui permet d'obtenir des agrégats métalliques insérés dans des matrices vitreuses	Production de nanopores dans un matériau de dimensions macroscopiques ou de nanostructures immobilisées dans une matrice	?
Recuit à basse température de phases amorphes « massives »	Des nanostructures peuvent être obtenues à partir de phases amorphes par traitement thermique de recristallisation	Alliages métalliques et Intermétalliques complexes avec trois à cinq éléments base Al, Zr, Fe.	Toute la gamme nanométrique
Plasma thermique	Les particules vaporisées ou fondues dans un plasma thermique sont trempées ou condensées sous forme de particules ultra fines	Des nanopoudres céramiques comme des carbures (TiC, TaC, SiC), des siliciures ($MoSi_2$), des oxydes dopés (TiO_2) ou complexes (HA, YIG, pérovskites)	?
Dépôt physique en phase vapeur	Le procédé PVD (Physical Vapor Deposition) met en	Des dépôts de TiN, CrN, (Ti,Al)N	?

	œuvre l'évaporation ou la pulvérisation d'une cible métallique solide.		
Méthodes chimiques			
Réactions en phase vapeur	Le procédé CVD (Chemical Vapor Deposition) permet l'élaboration de couches minces par réaction chimique entre un composé volatil du matériau à déposer et la surface du substrat à recouvrir.	Matériaux de natures très diverses (carbures, nitrures, oxydes, alliages métalliques, etc.).	Quelques nm à quelques µm
Réactions en milieu liquide	Mise en solution de réactifs conduisant à la formation de nanoparticules par modification des conditions physico-chimiques du milieu (pH, température, concentration, etc.).	La plupart des métaux et oxydes	Quelques nm à quelques centaines de nm
Réactions en milieu solide	Ce procédé recouvre de nombreuses voies de synthèses qui ont pour objet de contrôler la taille des nanoparticules. (notamment par la taille des produits initiaux, par la diffusion, par des sites réactionnels spécifiques ou par le volume réactionnel)	La plupart des métaux et oxydes	Quelques nm à quelques µm

Techniques sol-gel	Production de nanomatériaux à partir de solutions d'alkoxydes ou de solutions colloïdales sous forme de monolithes, de nano-pigments cristallisés ou de couches minces. Ce sont des techniques fondées sur des réactions de polymérisation inorganiques.	La plupart des oxydes	Quelques nm à quelques centaines de nm
Fluide supercritique avec réaction chimique	Ajustement continu des propriétés physico-chimiques du milieu réactionnel sur une grande échelle par ajustement des paramètres pression et température sur de petites échelles afin de contrôler la réaction chimique et ainsi l'élaboration du matériau	La plupart des métaux, oxydes et quelques nitrures	Quelques nm à quelques µm
Méthodes mécaniques			
Mécanosynthèse et activation mécanique de procédés de la métallurgie des poudres	La mécanosynthèse consiste à broyer des poudres micrométriques (1 à 50 µm) de plusieurs alliages pour les mélanger.	Tous les types de matériaux (céramiques, métalliques, polymères, semi conducteurs)	particules de quelques nm à particules microniques nanostructurées

Consolidation et densification	Les techniques de consolidation permettent d'obtenir des pièces massives à partir de matériaux pulvérulents (poudres métalliques, céramiques, semi-conducteurs et organiques).		
Forte déformation (hypercorroyage)	Raffiner la structure d'un matériau cristallin (métal, céramique), jusqu'à obtenir une taille de grains de quelques dizaines de nanomètres. Les techniques utilisées sont la torsion, l'extrusion, etc		

ANNEXE 2 : Exemples de propriétés recherchées par l'utilisation de nanoparticules dans différents secteurs d'activités (2,9)

Transport terrestre, aéronautique et spatial	Amélioration : des performances des moteurs, de la résistance mécanique et thermique des matériaux, de l'efficacité énergétique, de la sécurité, du confort, des matériaux autonettoyants ; Diminution de : la corrosion, la pollution, du coût, consommation de carburant ; développement de détecteurs de glace et de fissures des structures.
Electronique et communication	Développement de : mémoires haute densité, processus miniaturisés, écrans plats à éclairement brillant et très haute définition, polymères et composites nanostructurés permettant le développement de composants électroniques souples et de papier électronique.
Industrie chimique et matériaux	Développement de : céramiques, pigments, poudres et catalyseurs multifonctionnels, fils plus légers et plus résistants, inhibiteurs de corrosion, couches fonctionnelles (isolation thermique, antiadhésive, antistatique), peintures, vitres et vêtements auto nettoyants, membrane pour séparation de matériaux (traitement des eaux, dialyse), outils de coupe extrêmement durs etc.
Santé et industries pharmaceutiques, biomédicales, biotechnologiques et cosmétiques	Nouvelles approches pour un diagnostic médical plus précis (marqueurs fluorescents, contrastes accrus en imagerie, meilleure caractérisation de certains paramètres) traitements mieux ciblés et plus efficaces. En cosmétologie : amélioration des propriétés optiques (protection anti-UV), de la tenue (crèmes solaires résistantes à l'eau), de la brillance et de la transparence des produits, développement de nouveaux produits antirides, antivieillissement et antibactériens.
Agriculture	Meilleure absorption des pesticides, fertilisants et autres substances chimiques agricoles. Optimisation de la production animale par libération d'hormones de croissance et de vaccins sur demande, détection de pathogènes chez les animaux et les plantes.
Energie	Amélioration des performances des systèmes de production et d'utilisation de l'énergie, stockage de l'hydrogène, nouvelle génération de cellules photovoltaïques, production de batteries et cellules de combustion, optimisation de l'efficacité de l'énergie éolienne, matériaux isolants plus efficaces.

Secteur manufacturier	Conception d'équipements pour produire et incorporer des nanoparticules dans des produits à valeur ajoutée et assurer la caractérisation et la qualité ; ingénierie de précision pour la production de nouvelles générations d'instruments sur mesure, nouveaux processus et nouveaux outils pour manipuler la matière au niveau atomique et développement d'appareils divers.
Environnement et écologie	Réduction des émissions de polluants, dépollution des sites contaminés, traitements des effluents, protection des organismes sensibles et diminution des émissions de CO_2 ; récupération et recyclage des ressources existantes, amélioration de la décontamination et du recyclage des métaux.
Défense	Détecteurs d'agents chimiques et biologiques, explosifs plus puissants, systèmes furtifs, textiles légers et performants se réparant d'eux même, systèmes de surveillance miniaturisés et système de guidage plus précis.
Caoutchouc et matières plastiques	Réduction du poids et augmentation de la performance des pneumatiques, durée de vie accrue et recyclage. Diminution des émissions sonores.
Métallurgie	Amélioration des propriétés des métaux, diminution du frottement et de l'utilisation de lubrifiants lors de la fabrication des pièces ; outils de coupe plus durs et plus résistants à l'abrasion et à la corrosion, amélioration des performances d'usinage.

Références bibliographiques

1. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Biointerphases. 2007;2(4):MR17–R71.

2. Afsset. Les nanomatériaux: Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. 2006 p. 221.

3. Ris C. U.S. EPA health assessment for diesel engine exhaust: a review. Inhal. Toxicol. 2007;19 Suppl 1:229–39.

4. Pujalte I. Étude in vitro de la toxicité de nanoparticules métalliques (TiO2 , ZnO , CdS). 2011. p. 235.

5. Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part. Fibre Toxicol. 2006;3:11.

6. Papakostas D, Rancan F, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Nanoparticles in dermatology. Arch. Dermatol. Res. [Internet]. 2011 Oct [cited 2012 Oct 26];303(8):533–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21837474

7. Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R. Les liposomes: description, fabrication et applications. Biotechnol.Agrom.Soc.Environ. 2004;8(3):163–76.

8. Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. 1985 Nature Publishing Group. Group [Internet]. Nature Publishing Group; 1985;318(6042):162–3. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/318162a0

9. Ostiguy C, Roberge B, Woods C, Soucy B. Les nanoparticules de synthèse: Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. R646 IRSST. 2010 p. 159.

10. Preining O. The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. J. Aerosil Sci. 1998;5(6):481–4495.

11. Witschger O, Fabries J-F. Particules ultra-fines et santé au travail. 2- Sources et caractérisation de l'exposition. Cahiers de notes documentaires - INRS. 2005 p. 177.

12. Canadiennes C des académies. Petit et différent: perspective scientifique sur les défis réglementaires du monde nanométrique. 2008 p. 151.

13. Kish H. Semiconductor Photocatalysis Mechanistic and Synthetic Aspects. Angew. Chemie. 2013;52:812–47.

14. Chen X, Mao SS. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. Chem. Rev. [Internet]. 2007 Jul;107(7):2891–959. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17590053

15. Dombu youta C lionel. Utilisation de nanoparticules pour délivrer des protéines dans les épithéliums respiratoires. Caractérisation des mécanismes impliqués. 2012. p. 200.

16. Goodson RJ, Katre N V. Site-directed pegylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site. Biotechnology. (N. Y). 1990;8(4):343–6.

17. Morris MC. Cancer et nanotechnologie. Innovation en diagnostic, vectorisation et thérapeutique. Rayonnem. du CNRS. 2012;58.

18. Zhao L, Seth A, Wibowo N, Al E. Nanoparticle vaccines. Vaccine. 2013;32(2014):327–37.

19. Delville M-H, Le Trequesser Q, Seznec H. Functionalized nanomaterials: their use as contrast agents in bio imaging: mono and multimodal approaches. Nanotechnol. Rev. 2012;95.

20. Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Al. E. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? Regul. Toxycology Pharmacol. 2007;49:217–28.

21. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, et al. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. Science (80-.). 2005;307:538.

22. Bappaditya S, Haoheng Y, Fischer NO, Jing S, Al. E. Protein-passivated Fe3O4 nanoparticles low toxicity and rapid heating for thermal therapy. J. Mater. Chem. 2008;18:1204–8.

23. Ladj R, Bitar A, Eissa MM, Fessi H, Mugnier Y, Le Dantec R, et al. Polymer encapsulation of inorganic nanoparticles for biomedical applications. Int. J. Pharm. Elsevier B.V.; 2013;458(1):230–41.

24. Winau F, Westphal O, Winau R. Paul Ehrlich--in search of the magic bullet. Microbes Infect. 2004;6(8):786–9.

25. De Leeuw J, de Vijlder HC, Bjerring P, Neumann H a M. Liposomes in dermatology today. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. [Internet]. 2009 May [cited 2012 Nov 15];23(5):505–16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19175703

26. Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. Drugs. 2009;69(3):361–92.

27. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2007;65(3):259–69.

28. Lucas T. Nanotechnologies: Frappes médicinales. L'usine Nouv. 2011;(3228):40–3.

29. Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Fukushima S, et al. Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(beta-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. J. Control. Release. 2000;64(1-3):143–53.

30. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. Pharm. Res. 2009;26(5):1025–58.

31. Vauthier C, Dubernet C, Chauvierre C, Brigger I, Couvreur P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. J. Control. Release. 2003;93(2):151–60.

32. Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. Drug Discov. Today. 2003;8(24):1112–20.

33. Wijagkanalan W, Kawakami S, Hashida M. Designing dendrimers for drug delivery and imaging: pharmacokinetic considerations. Pharm. Res. 2011;28(7):1500–19.

34. Naz S, Quadir I, Ali M, Al. E. Nanotechnology for imaging and drug delivrey in cancer. J.Chem.Soc.Pak. 2012;34(1):107–11.

35. Caron J. Conception de nouveaux bioconjugués “squalénisés” anticacéreux dotés de propriétés d’auto-assemblage : synthèse, caractérisation des nanoparticules et évaluation biologique. 2011. p. 322.

36. Dhar S, Daniel WL, Giljohann DA, Mirkin CA, Lippard SJ. Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum(IV) warheads. J. Am. Chem. Soc. 2009;131(41):14652–3.

37. Smith L, Kuncic Z, Ostrikov K, Kumar S. Nanoparticles in cancer imagering and thérapy. J. Nanomater. 2012;2012:7.

38. Nanobiotix. Nanobiotix reçoit l’autorisation de l’ANSM pour démarrer un nouvel essai clinique avec son produit leader NBTXR3 [Internet]. [cited 2014 Mar 8]. Available from: http://www.nanobiotix.com/fr/news/release/nanobiotix-recoit-lautorisation-de-lansm-pour-demarrer-un-nouvel-essai-clinique-avec-son-produit-leader-nbtxr3/

39. Navedul H, Rafallah R. K, Parvez N, Yadav S, Al. E. Nanotechnology in Cancer Therapy: A Review. J. Chem. Pharm. Res. 2010;2(161-168).

40. Bonnemain B. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. J. Drug Target. 1998;6(3):167–74.

41. Morris MC. Fluorescent biosensors of intracellular targets from genetically encoded reporters to modular polypeptide probes. Cell Biochem. Biophys. 2010;56(1):19–37.

42. Gazeau F, Wilhelm C. Nanoparticules et stimuli magnétiques pour l ’ imagerie médicale et la thérapie Nanomagnetism for medical imaging and therapy. 2012;103–10.

43. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. Biotechnology. 2010;28(11):580–9.

44. Chimie association toxicologie. NANOARGENT-une-nouvelle-carrière pour l'argent. 2010.

45. Benn TM, Westerhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. Environ. Sci. Technol. 2008;42(11):4133–9.

46. Chadhry Q, Scotter M, Blackburn J, Al. E. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. Food Addit. Contam. 2008;25(3):241–58.

47. Raj S, Jose S, Sumod US, Sabitha M. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. J. Pharm. Bioallied Sci. [Internet]. 2012 Jul [cited 2012 Oct 23];4(3):186–93. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/

48. R De Paula L, L.A. Parussulo A, Araki K, E. Toma H. Evaluation of Sun Protection Factor of Cosmetic Formulations by a Simple Visual In Vitro Method Mimicking in the In Vivo Method. J. Pharm. Sci. 2011;101(2):726–32.

49. Australian Government. A review of the scientific literature on the safety of nanoparticulate titanium dioxide or zinc oxide in sunscreens. 2009 p. 32.

50. Précaution C de la préventention et de la. Nanoparticules. Quels dangers? Quels risques? 2006 p. 64.

51. Seaton a, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. Lancet [Internet]. 1995 Jan 21;345(8943):176–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500824

52. Reijnders L. Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. J. Clean. Prod. 2006. p. 124–33.

53. Oberdöster G, Maynard A, Donaldson K, Al. E. Principles for characterizing the potential human health effects. Part. Fibre Toxicol. 2005;2(8):35.

54. Simon M. Analyse par microfaisceau d'ions. Application à l'étude de la barrière cutanée et à la nanotoxicologie in vitro. 2009. p. 205.

55. Bachelez H, Basset S, Crickx B. Comprendre la peau. Les grandes fonctions de la peau. Ann Dermatol Venereol. 2005;132(8S49-68).

56. Bartek J, Ph D, Labudde JA, All E. Skin permeability in vivo comparison in rat, rabbit, pig and man. J. Investig. dermatology. 1972;58(3):114–23.

57. Carillo S. Histologie des voies aériennes supérieures. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes. 2004. p. 11.

58. Carillo S. Histologie de l'appareil respiratoire. Voies aériennes profondes. Faculté de médecine Montpellier-Nîmes. 2004. p. 31.

59. Lesné C, Picot A. Gaz et particules minérales: les voies respiratoires et ses principaux mécanismes de défense. 1998 p. 25.

60. Nazarenko Y, Zhen H, Han T, Lioy PJ, Mainelis G. Potential for inhalation exposure to engineered nanoparticles from nanotechnology-based cosmetic powders. Environemental heath Perspect. 2012;120(6):885–92.

61. Florence AT. Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential? Drug Discov. Today Technol. 2005;2(1):75–81.

62. Delie F. Evaluation of nano- and microparticle uptake by the gastrointestinal tract. Adv. Drug Deliv. Rev. 1998;34:221–33.

63. Florence AT. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. Pharm. Res. 1997;14(3):259–66.

64. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, et al. Renal clearance of quantum dots. Nat. Biotechnol. 2007;25(10):1165–70.

65. Pujalté I, Passagne I, Brouillaud B, Tréguer M, Durand E, Ohayon-Courtès C, et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. Part. Fibre Toxicol. 2011;8:10.

66. Gao Y, Cranston R. Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles. Texile Res. J. 2008;78(60):60–72.

67. Loretz L, Api AM, Barraj L, Burdick J, Davis DA, Dressler W, et al. Exposure data for personal care products: hairspray, spray perfume, liquid foundation, shampoo, body wash, and solid antiperspirant. Food Chem. Toxicol. [Internet]. 2006 Dec [cited 2012 Oct 26];44(12):2008–18. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920244

68. Colton T. Statistics in Medecine. 1974.

69. Loretz LJ, Api a M, Babcock L, Barraj LM, Burdick J, Cater KC, et al. Exposure data for cosmetic products: facial cleanser, hair conditioner, and eye shadow. Food Chem. Toxicol.

[Internet]. 2008 May [cited 2012 Oct 26];46(5):1516–24. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243463

70. Kimura E, Kawano Y, Todo H, Ikarashi Y, Sugibayashi K. Measurement of skin permeation/penetration of nanoparticles for their safety evaluation. Biol. Pharm. Bull. [Internet]. 2012 Jan;35(9):1476–86. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22975498

71. Butz T, Reinert T, Pinheiro T, Moretto P, Al. E. NANODERM. Quality of Skin as a Barrier to ultra-fine Particles. 2007 p. 55.

72. Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee N V, Zheng J, Haines D, Parmiter D, et al. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO2 particles. Toxicol. Sci. 2010;115(1):156–66.

73. Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. Australas. J. Dermatol. 1996;37(4):185–7.

74. Gamer A, Leilbold E, Van Ravenzwaay B. The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. Toxicol. Vitr. [Internet]. Elsevier; 2006 [cited 2014 Jan 9];20(3):301–7. Available from: http://cat.inist.fr

75. Gulson B, McCall M, Korsch M, Gomez L, Casey P, Oytam Y, et al. Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. Toxicol. Sci. 2010;118(1):140–9.

76. Lademann J, Richter H, Schanzer S, Knorr F, Meinke M, Sterry W, et al. Penetration and storage of particles in human skin: perspectives and safety aspects. Eur. J. Pharm. Biopharm.

[Internet]. Elsevier B.V.; 2011 Apr [cited 2012 Nov 8];77(3):465–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21056659

77. Otberg N, Richter H, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. J.Invest Dermatol. 2004;122(0022-202X (Print)):14–9.

78. Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. J. Invest. Dermatol. [Internet]. 2004 Jul [cited 2014 Jan 9];123(1):168–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15191557

79. Patzelt A, Richter H, Knorr F, Schäfer U, Lehr C-M, Dähne L, et al. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. J. Control. Release. 2011;150(1):45–8.

80. Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, et al. Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2007;66(2):159–64.

81. Novak N, Bieber T, Leung DYM. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 2003;112(6 Suppl):S128–S139.

82. Leung DYM, Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet. 2003;361(9352):151–60.

83. Monteiro-Riviere N a, Wiench K, Landsiedel R, Schulte S, Inman a O, Riviere JE. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. Toxicol. Sci. [Internet].

2011 Sep [cited 2012 Oct 26];123(1):264–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642632

84. Hoet PH, Brüske-Hohlfeld I, Salata O V. Nanoparticles – known and unknown health risks. J. Nanobiotechnology. BioMed Central; 2004;2:12.

85. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science. 2006;311(5761):622–7.

86. Jaeger A, Weiss DG, Jonas L, Kriehuber R. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. Toxicology [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Jun 14 [cited 2012 Oct 16];296(1-3):27–36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449567

87. Tyner KM, Wokovich AM, Godar DE, Doub WH, Sadrieh N. The state of nano-sized titanium dioxide (TiO2) may affect sunscreen performance. Int. J. Cosmet. Sci. 2011;33(3):234–44.

88. Tu M, Huang Y, Li H-L, Gao Z-H. The stress caused by nitrite with titanium dioxide nanoparticles under UVA irradiation in human keratinocyte cell. Toxicology [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Sep 4 [cited 2012 Oct 16];299(1):60–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22627297

89. Yanagisawa R, Takano H, Inoue K, et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Aggravate Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. Exp. Biol. Med. 2009;234:314–22.

90. Maquieira Á, Brun EM, Garcés-García M, Puchades R. Aluminum oxide nanoparticles as carriers and adjuvants for eliciting antibodies from non-immunogenic haptens. Anal. Chem.

[Internet]. 2012;84(21):9340–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23005036

91. Israeli E, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y. Macrophagic Myofaciitis a Vaccine (alum) Autoimmune-Related Disease. Clin. Rev. Allergy Immunol. 2011;41(2):163–8.

92. Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Cline P, Hincenbergs M. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. J. Cell. Physiol. 1990;143(2):294–302.

93. Zamansky GB, Nguyen U, Chou IN. An immunofluorescence study of the calcium-induced coordinated reorganization of microfilaments, keratin intermediate filaments, and microtubules in cultured human epidermal keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 1991;97(6):985–94.

94. Simon M, Barberet P, Delville M-H, Moretto P, Seznec H. Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. Nanotoxicology. 2011;5(2):125–39.

95. Furukawa F, Doi Y, Suguro M, Al. E. Lack of skin carcinogenicity of topically applied titanium dioxide nanoparticles in the mouse.pdf. Food Chem. Toxicol. 2011;49:744–9.

96. Moon E-Y, Yi G-H, Kang J-S, Al. E. An increase in mouse tumor growth by an in vivo immunomodulating effect of titanium dioxide nanoparticles. J. Immunotoxicol. Journal of immunotoxicology; 2011;8(1):56–7.

97. Male D. Immunologie, aide mémoire illustré. 2005. p. 141.

98. Zogovic NS, Nikolic NS, Vranjes-Djuric SD, Harhaji LM, Vucicevic LM, Janjetovic KD, et al. Opposite effects of nanocrystalline fullerene (C(60)) on tumour cell growth in vitro and in vivo and a possible role of immunosupression in the cancer-promoting activity of C(60). Biomaterials. 2009;30(36):6940–6.

99. Danovaro R, Bongiorni L, Corinaldesi C, Giovannelli D, Damiani E, Astolfi P, et al. Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. Environ. Health Perspect. [Internet]. 2008 Apr;116(4):441–7. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/2291018

100. Pluskota A, Horzowski E, Bossinger O, von Mikecz A. In Caenorhabditis elegans nanoparticle-bio-interactions become transparent: silica-nanoparticles induce reproductive senescence. PLoS One. 2009;4(8):e6622.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

THESE soutenue par : GUITOU Marie-Anne
TITRE : Nanoparticules et santé : des applications aux risques potentiels.
L'exemple du TiO_2.
TH. D. Pharmacie : Bordeaux/2014 ; n°27

Résumé :

Les nanotechnologies constituent un champ de recherche et de développement important depuis le début du XXI^{ème} siècle. Elles reposent sur la capacité à manipuler la matière à l'échelle du nanomètre (10^{-9} m) voire de l'atome. L'utilisation des nanoparticules au niveau mondial ne cesse de s'accroître notamment sur le plan médical, environnemental et industriel. Elles permettent la création de nouvelles classes de matériaux aux propriétés innovantes. Ainsi, ces nanoparticules produites intentionnellement sont utilisées dans des produits cosmétiques et d'hygiène, dentifrices, additifs alimentaires, articles de sport, pneus... De plus, leurs propriétés particulières en font des outils extrêmement intéressants dans plusieurs domaines de la recherche fondamentale et clinique, tels que l'oncologie, l'imagerie médicale, le diagnostic, l'administration de médicaments, la fabrication de biomatériaux, ou encore la vaccination. Il est indispensable de clarifier l'impact de ces nanoparticules sur la santé en raison de leur multiplicité et des différentes voies d'exposition possibles. Il est à ce jour difficile de se prononcer quant à l'innocuité de ces éléments, les résultats étant parfois contradictoires, à l'instar des données actuelles relatives à la pénétration de la barrière cutanée par les nanoparticules du dioxyde de titane (TiO_2) contenues dans les dermo-cosmétiques. L'étude du devenir des nanoparticules dans notre organisme (toxicocinétique) et de leurs effets cellulaires (stress oxydatif, cytotoxicité, génotoxicité) reste indispensable afin de garantir leur sécurité d'utilisation. Ce manuscrit propose une introduction générale aux nanotechnologies et à leurs applications par une approche du nanomonde et l'étude particulière de l'éventuelle toxicité du TiO_2 contenu dans les topiques cosmétiques.

Title: Nanoparticles and health: applications to potential risks. The example of TiO_2

Mots clés: Nanoparticules, nanotoxicité, applications médicales, dermo-cosmétiques, TiO_2, pénétration cutanée.
Keywords: Nanoparticles, nanotoxicity, medical applications, dermo-cosmetics, TiO_2, skin penetration.

UFR des Sciences Pharmaceutiques
Université de Bordeaux
Pôle Sciences de la santé
146, Rue Léo Saignat
33 076 Bordeaux Cedex