 Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé DEDIM / DSM / Unité nouveaux dispositifs	Rapport NanoDM : Evaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux	Date : 22/02/2011
		Version 5 finale
		Réf. : DTABAB101115931

EVALUATION BIOLOGIQUE

DES DISPOSITIFS MEDICAUX

CONTENANT DES NANOMATERIAUX

Rapport scientifique

AVANT-PROPOS

Les connaissances et les pratiques dans le domaine de la santé sont en constante évolution grâce aux technologies nouvelles et émergentes, qui améliorent la qualité du diagnostic et des soins aux patients. Cependant, ce foisonnement d'innovations n'est pas nécessairement aisé à suivre pour tous.

L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) exerce la mission de veille et de sécurité sanitaire des produits de santé. Elle a notamment en charge de procéder à l'évaluation des bénéfices et des risques liés à l'utilisation des dispositifs médicaux, en particulier en élaborant des recommandations.

L'objectif principal de telles recommandations à visée de sécurité sanitaire est de fournir aux fabricants, aux professionnels de santé et aux patients/utilisateurs une synthèse des connaissances scientifiques et de l'opinion d'experts sur un thème précis. Elles constituent ainsi une aide à la décision en définissant ce qui est approprié, ce qui ne l'est pas ou ne l'est plus, et ce qui reste incertain ou controversé.

Les recommandations sur l'évaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux contenues dans ce document ont été élaborées par un groupe d'experts scientifiques multidisciplinaires, créé et nommé au *Bulletin officiel Santé-Protection sociale – Solidarité* n°2010/11 du 15 décembre 2010 par décisions du directeur général de l'Afssaps le 13 octobre 2010 (cf. Annexe I).

PRESENTATION DES INTERVENANTS

Equipe projet

- *Chef du projet et rédaction du rapport*

Mme Anh BOURCET, Direction de l'évaluation des dispositifs médicaux, Afssaps

- *Coordination et secrétariat scientifique*

Mme Véronique LEMANISSIER, Direction de l'évaluation des dispositifs médicaux, Afssaps

- *Encadrement*

M. Laurent CORTEEL, Direction de l'évaluation des dispositifs médicaux, Afssaps

- *Secrétariat administratif*

Mme Irma LOUBER, Direction de l'évaluation des dispositifs médicaux, Afssaps

Groupe de travail

M. Nicolas FELTIN, Laboratoire National de métrologie et d'Essais, Trappes

Mme Sylvie FRAMERY, BIOMATECH – a NAMSA Company, Chasse sur Rhône

Mme Marie-Françoise HARMAND, LEMI, Bordeaux

M. Joël POUPON, Hôpital Lariboisière, Paris

Mme Muriel VAYSSADE, Université Technologique de Compiègne, Compiègne

M. Christian VILLIERS, INSERM, Grenoble

Président du groupe de travail : M. Joël POUPON

Hiérarchie

Mme Cécile VAUGELADE, Direction de l'évaluation des dispositifs médicaux, Afssaps

M. Nicolas THEVENET, Direction de l'évaluation des dispositifs médicaux, Afssaps

M. Jean-Claude GHISLAIN, Direction de l'évaluation des dispositifs médicaux, Afssaps

Relecteurs externes à l'Afssaps

Mme Marie CARRIERE, Commissariat à l'Energie Atomique, Gif-sur-Yvette

Mme Marie-Line COSNIER, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble

M. Elias FATTAL, Faculté de Pharmacie, Chatenay Malabry

M. Eric GAFFET, CNRS, Belfort

M. Gaël GRIMANDI, CHU de Nantes, Nantes

M. Denis LABARRE, Faculté de pharmacie, Chatenay Malabry

Mme Francelyne MARANO, Université Paris Diderot, Paris

M. Daniel MARZIN, Faculté de pharmacie, Lille

M. Fabrice SAUTER, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble

Mme Najet YAGOUBI, Faculté de pharmacie, Chatenay Malabry

Mme Pascale COUSIN, Représentante du SNITEM

Mme Céline WURTZ, Représentante de l'APPAMED

Relecteurs internes à l'Afssaps

Mme Dominique ABDON, Direction de l'inspection et des établissements, Afssaps

Mme Corinne CIVADE, Direction des laboratoires et des contrôles, Afssaps

M. Stéphane PALIES, Direction générale, Afssaps

M. Didier SAUVAIRE, Direction des laboratoires et des contrôles, Afssaps

SOMMAIRE

RESUME	6
INTRODUCTION.....	8
I. Etat de l'art sur les nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux	10
I.A. Terminologie.....	10
I.B. Particularités de la dimension nanométrique	13
I.B.1. Effets de surface dominants	13
I.B.2. Agglomération et agrégation.....	13
I.B.3. Effets de taille sur les propriétés thermodynamiques.....	14
I.B.4. Effets de taille sur les propriétés mécaniques	14
I.B.5. Effets quantiques	15
I.B.6. Effets de la structure cristalline.....	16
I.B.7. Echelle nanométrique et échelle biologique	16
I.C. Dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux.....	18
I.C.1. Matériel médical.....	19
I.C.2. Produits dentaires et orthopédiques.....	21
I.C.3. Dispositifs cardiovasculaires.....	24
I.C.4. Chirurgie	26
I.C.5. Nanotechnologies dans le traitement des cancers.....	27
I.C.6. Dispositifs médicaux implantables actifs	28
I.C.7. Dispositifs de diagnostic et de surveillance en continu	29
I.D. Bilan.....	30
II. Evaluation biologique des nanomatériaux.....	31
II.A. Etat des connaissances sur la toxicité des nanomatériaux.....	31
II.A.1. Interactions entre nanomatériaux et systèmes biologiques	32
II.A.2. Toxicocinétique et biodistribution.....	34
II.A.3. Cytotoxicité	38
II.A.4. Immunotoxicologie, hypersensibilité retardée et irritation	40
II.A.5. Hémostabilité	44
II.A.6. Toxicité systémique	45
II.A.7. Génotoxicité	46
II.A.8. Cancérogénicité	48
II.A.9. Toxicité sur la reproduction et le développement.....	49
II.A.10. Neurotoxicité.....	50
II.B. Etat des connaissances sur l'évaluation toxicologique de certains nanomatériaux	51
II.B.1. Nanotubes de carbone	51
II.B.2. Nanoparticules d'argent.....	54
II.B.3. Nano-objets issues de débris d'usure et de dégradation	56
II.C. Paramètres de caractérisation pertinents pour l'évaluation toxicologique des nanomatériaux.....	59
II.C.1. Paramètres physiques	59
II.C.2. Paramètres chimiques	64
II.C.3. Conclusion	66
III. Les référentiels actuels des dispositifs médicaux sont-ils adaptés aux dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux ?	68
III.A. Rappel de la réglementation actuelle pour les dispositifs médicaux.....	68
III.A.1. Directive 93/42/CE et marquage CE	68
III.A.2. Norme NF EN ISO 14971 (Gestion des risques).....	69
III.A.3. Normes NF EN ISO 10993 (Evaluation biologique)	70
III.B. Précautions pour le cas des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux.....	72
III.B.1. Caractérisation physico-chimique et reproductibilité des lots de nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux	72
III.B.2. Préparation des échantillons et questions d'unité	74

III.B.3. Toxicocinétique et étude de biodégradation.....	77
III.B.4. Tests de cytotoxicité	79
III.B.5. Tests de génotoxicité.....	80
III.B.6. Immunotoxicologie, hypersensibilité retardée et irritation	83
III.B.7. Tests d'hémocompatibilité	84
III.B.8. Tests de toxicité systémique (aiguë, subaiguë/subchronique et chronique).....	84
III.B.9. Cancérogénicité, reprotoxicité et neurotoxicité.....	85
III.C. Analyse bénéfices/risques.....	85
III.D. Autres référentiels	87
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	90
RECOMMANDATIONS A L'ATTENTION DES FABRICANTS SUR L'EVALUATION BIOLOGIQUE DES DISPOSITIFS MEDICAUX CONTENANT DES NANOMATERIAUX	92
GLOSSAIRE	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99
ANNEXE I : Extrait du <i>Bulletin Officiel Santé – Protection sociale – Solidarité</i> n°2010-11 du 15 décembre 2010.....	114
ANNEXE II : Liste des dispositifs médicaux dans le domaine des nanotechnologies, identifiés lors des travaux du présent rapport.....	116

RESUME

L'essor des technologies à l'échelle nanométrique, les nanotechnologies, permet le développement d'applications innovantes. De nombreux dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux sont en cours de développement et certains sont déjà commercialisés. Cependant, les matériaux sous forme nanométrique étant peu explorés et leurs propriétés étant parfois différentes de celles de leurs homologues massifs (*i.e.* sans dimension nanométrique), leur risque sur la santé est encore mal connu.

Partant de ce constat, l'Afssaps est désireuse de savoir si les méthodes d'évaluation conventionnelles sont adéquates pour appréhender correctement les risques liés à l'utilisation des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Elle a donc mis en place en 2010 un groupe de travail constitué d'experts multidisciplinaires ayant pour missions de réaliser un état des connaissances sur les dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux et leur évaluation biologique ainsi que de proposer des recommandations à destination des fabricants développant ce type de dispositif médical. Les travaux de ce groupe sont colligés dans le rapport intitulé « Evaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux ».

La première partie de ce rapport dresse un panorama des avancées apportées par les nanomatériaux et leur utilisation dans des dispositifs médicaux déjà sur le marché et ceux en développement. La seconde partie expose les principales connaissances actuelles sur les effets biologiques des nanomatériaux. La troisième partie est consacrée au cadre réglementaire et normatif en vigueur pour examiner son adéquation avec les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Enfin, sur la base de ces analyses, le rapport fournit des recommandations à destination des fabricants de dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux pour évaluer au mieux les risques biologiques, durant le cycle de vie du dispositif médical : de la conception au recyclage après usage, en passant par son utilisation.

En conclusion, les référentiels normatifs sont adaptés pour l'évaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Toutefois, des adaptations au cas par cas sont nécessaires pour prendre en compte la spécificité des nanomatériaux. En premier lieu, il est nécessaire de démontrer comme dans toute évaluation d'un dispositif médical le rapport bénéfices/risques favorable. Plus spécifiquement, il est demandé d'argumenter l'utilité de l'ajout des nanomatériaux dans le dispositif médical (bénéfices supérieurs aux risques éventuellement induits). En deuxième lieu, les recommandations rédigées par l'Afssaps apportent un support aux fabricants de dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Ces recommandations abordent notamment la transparence de l'information, l'identification et la caractérisation des matériaux utilisés et les précautions dans l'évaluation des risques biologiques.

Le monde des nanotechnologies en constante évolution constitue un réel défi pour les scientifiques comme pour les autorités nationales de régulation. Pour faire avancer la connaissance et l'innovation tout en garantissant une meilleure maîtrise des risques, les actions coordonnées multidisciplinaires et internationales doivent continuer à être menées afin d'améliorer la qualité et la sécurité des produits à

l'usage des professionnels de santé et des patients. L'Afssaps porte une attention spécifique sur les nouveaux dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux mis sur le marché français.

INTRODUCTION

L'essor des technologies à l'échelle nanométrique, les nanotechnologies, permet le développement d'applications innovantes. En effet, les propriétés physico-chimiques et biologiques particulières des nanomatériaux sont exploitées dans de nombreux domaines comme l'électronique, l'énergie, la cosmétologie, la médecine ou la pharmacie. Ces nanomatériaux, très divers et prometteurs, pourraient avoir un impact considérable dans le domaine des dispositifs médicaux, sur le diagnostic, la thérapie et la prévention des maladies.

De nombreux dispositifs médicaux sont en cours de développement et certains sont déjà commercialisés. Cependant, les matériaux sous forme nanométrique étant peu explorés et leurs propriétés étant parfois différentes de celles de leurs homologues massifs (*i.e.* sans dimension nanométrique), leur risque sur la santé est encore mal connu. Par conséquent, la présente préoccupation de l'Afssaps est de savoir si les méthodes d'évaluation conventionnelles sont adéquates pour appréhender correctement les risques liés à l'utilisation des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux.

L'objet de ce travail est d'établir des recommandations à destination des fabricants pour analyser et évaluer les risques biologiques des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Le champ d'application concerne tous les dispositifs médicaux (incluant également les dispositifs médicaux implantables actifs et les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*), qui contiennent des nanomatériaux et susceptibles d'être en contact avec le corps du patient ou de l'utilisateur. Ce rapport souhaite ainsi apporter des éléments de réflexion pour l'évaluation du rapport bénéfices/risques dans un cadre de sécurité sanitaire. Il s'appuie sur une synthèse des connaissances scientifiques actuelles sur les propriétés et comportements biologiques des nanomatériaux.

L'analyse bibliographique et de l'état du marché des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux s'est arrêtée en novembre 2010. La première partie du rapport dresse un panorama des avancées apportées par les nanomatériaux et leur utilisation dans des dispositifs médicaux déjà sur le marché et ceux en développement. La seconde partie expose les principales connaissances actuelles sur les effets biologiques des nanomatériaux. La troisième partie est consacrée au cadre réglementaire et normatif en vigueur pour examiner son adéquation avec les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Enfin, sur la base de cette analyse, le rapport fournit des recommandations à destination des fabricants de dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux pour analyser et évaluer au mieux les risques biologiques, durant le cycle de vie du dispositif médical : de la conception au recyclage après usage, en passant par son utilisation.

Seule la problématique liée aux dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux a été étudiée dans ce travail. Les conséquences sanitaires d'une exposition aux nanomatériaux d'origine

professionnelle, industrielle, alimentaire, cosmétique ou environnementale ne sont pas abordées. Les risques sont inhérents à une application bien définie et ne sont ni transposables, ni extrapolables d'un contexte à un autre : il faut les considérer au cas par cas.

I. Etat de l'art sur les nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux

Le préfixe **nano**, du grec *νανος* signifiant *nain*, désigne le milliardième de l'unité de base : le nanomètre est donc le milliardième du mètre (10^{-9} m ou nm). Dès 1959, le physicien Richard Feynman a introduit le concept de la nanotechnologie dans son discours intitulé « There's plenty of room at the bottom »*, envisageant la manipulation de la matière à l'échelle des molécules et les atomes comme des objets macroscopiques. Les nanotechnologies prennent leur envol dès les années 1980, notamment avec l'invention de deux instruments de microscopie optique permettant d'observer et d'interagir avec la matière à l'échelle atomique ou subatomique : le microscope à effet tunnel (STM) en 1981 et le microscope à force atomique (AFM) deux ans après. Quelques années auparavant, les chercheurs ont déjà commencé à exploiter des changements de propriétés physico-chimiques à l'échelle nanométrique par rapport au macroscopique, pour créer des matériaux nouveaux, plus performants, multifonctionnels... Certains nanomatériaux sont utilisés dès l'Antiquité pour leurs propriétés particulières, mais c'est à l'aube du XXI^e siècle que les productions industrielles se sont diversifiées dans la nature chimique des nanomatériaux fabriqués, avec les fullerènes et la miniaturisation des composants électroniques.

Parmi les secteurs impliqués dans les nanotechnologies comme l'énergie, l'automobile, le bâtiment, l'habillement, la cosmétique ou l'alimentation, le monde de la Santé fonde de grands espoirs sur l'apport des nanomatériaux et des dispositifs nanométriques pour révolutionner ce champ. La nanomédecine promet des changements fondamentaux sur la prévention, le diagnostic et le traitement des pathologies, avec des nanosystèmes à actions ciblées et complexes de réparation ou de traitement au niveau cellulaire. Des applications sont développées, entre autres, en chirurgie, dans le diagnostic, dans le traitement des cancers, l'imagerie moléculaire, les dispositifs médicaux et l'ingénierie tissulaire. De nombreux dispositifs issus de la recherche en nanotechnologie sont en cours de développement et quelques uns sont déjà commercialisés.

I.A. Terminologie

La définition exacte des termes employés pour décrire la technologie et les matériaux utilisés à l'échelle nanométrique fait encore débat au niveau scientifique, industriel et juridique dans le Monde.

* Il y a beaucoup de place en bas

Néanmoins, la définition communément admise désigne comme matériaux à l'échelle nanométrique les matériaux dont au moins une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nm et avec la notion de nouvelles propriétés physiques, chimiques et biologiques, spécifiques à cette petite échelle. Au moment de la rédaction de ce rapport, étant donné qu'il n'y a pas encore de consensus international clair sur les terminologies, **nous nous référons dans ce document aux définitions données par l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO)**,². Par conséquent, pour une bonne compréhension du présent document, nous rappelons ci-dessous ce que nous entendons dans les différents termes utilisés.

● **Echelle nanométrique**

D'après les définitions de l'ISO, **l'échelle nanométrique** désigne la gamme de taille allant d'environ 1 à 100 nm.² Il convient de préciser que les frontières sont approximatives, indiquant une gamme de taille typiquement, mais non exclusivement entre 1 et 100 nm. La taille limite inférieure a été introduite pour éviter que ne soient assimilés à des nano-objets ou nanostructures un atome individuel ou un petit groupe d'atomes. De même, bien que dépassant l'échelle des 100 nm, certains objets sont considérés comme des nano-objets, si leurs caractéristiques sont différentes de celles extrapolées du même objet à une échelle plus grande.

● **Nanotechnologie**

La **nanotechnologie** désigne la manipulation et le contrôle de la matière et des procédés à l'échelle nanométrique, pour exploiter les phénomènes et propriétés liés à cette dimension, distincts de ceux d'atomes individuels, de molécules ou de matériaux macroscopiques. La terminologie « manipulation et contrôle » inclut la synthèse de matériau.

Les nanotechnologies impliquent donc la fabrication de structures, de dispositifs et de systèmes à partir de procédés permettant de structurer la matière à l'échelle nanométrique.

● **Nanomatériau**

Au sein des nanotechnologies, les **nanomatériaux** occupent une place centrale. Les nanomatériaux sont des matériaux dont au moins une des dimensions externes est à l'échelle nanométrique (**nano-objets**, ou possèdent une structure interne ou une surface structurée à l'échelle nanométrique (**matériaux nanostructurés**) et présentent une ou plusieurs nouvelles propriétés physiques, chimiques et biologiques spécifiques à cette petite échelle. Ce terme générique inclut les nano-objets et les matériaux nanostructurés.

Il est utile de différencier les nanomatériaux naturels et non intentionnels de ceux manufacturés. Les **nanomatériaux manufacturés** sont fabriqués par l'homme dans un cadre industriel ou de recherche. En revanche, les **nanomatériaux naturels** peuvent être des nanoparticules ou agrégats nanométriques provenant du cosmos, des volcans, des incendies de forêts, de certains minéraux comme les argiles ou de la dégradation des squelettes d'animaux. Les **nanomatériaux non intentionnels** d'origine anthropique désignent les nanoparticules atmosphériques ou particules ultrafines émises par le trafic automobile, les incinérateurs, dans les

fumées d'usine ...Elles peuvent également se former secondairement dans l'atmosphère à partir des polluants organiques volatiles.

On désigne par **nanomatériaux libres** les nanomatériaux qui ne sont pas encapsulés ou liés de telle manière qu'ils ne peuvent pas être libérés dans des organes, tissus ou cellules de l'utilisateur.

Les **matériaux nano-renforcés** incorporent dans leurs matrices des nano-objets pour apporter une nouvelle fonctionnalité ou modifier les propriétés physiques et mécaniques. C'est le cas par exemple des nanocomposites qui sont utilisés pour renforcer la résistance à l'usure dans des utilisations de renforts.

- **Matériau nanostructuré**

Un **matériau nanostructuré** est un matériau possédant une structure surfacique ou interne à l'échelle nanométrique et qui possède une ou plusieurs nouvelles propriétés physiques, chimiques et biologiques spécifiques à cette petite échelle. Un exemple est le matériau dont les surfaces contiennent des pores nanométriques est un matériau nanostructuré.

Il est possible de nano-structurer les surfaces des matériaux par incision, par lithographie, par inclusion de nanoparticules, ou par un revêtement d'épaisseur nanométrique... Ces revêtements sont généralement obtenus par dépôts physique ou chimique (plasma, électrochimie, ablation laser, ...).

- **Nano-objet**

Un **nano-objet** est un matériau avec une, deux ou trois dimensions externes à l'échelle nanométrique. La morphologie des nano-objets est variée.

Une **nanoparticule** est un nano-objet ayant ses trois dimensions externes à l'échelle nanométrique. Les nanoparticules ne sont pas toutes des sphères, mais peuvent avoir des formes d'aiguilles, de bâtonnets allongés, des structures à ressort, etc.

Les nano-objets avec deux dimensions externes à l'échelle nanométrique, et la troisième nettement plus grande, sont par exemple des **nanofibres**, **nanotubes**, **nanofilaments** ou **nanobâtonnets**.

Les nano-objets dont une dimension externe est à l'échelle nanométrique et dont les deux autres dimensions sont nettement plus grandes, sont typiquement des **nanofilms**, **nanocouches** ou **nanorevêtements**.

I.B. Particularités de la dimension nanométrique

Les propriétés d'un matériau dépendent de sa structure et de la composition chimique. Mais le passage à l'échelle nanométrique peut engendrer des modifications des caractéristiques physico-chimiques importantes. En dessous d'une certaine dimension, il y a possibilité de changement d'une ou plusieurs propriétés physico-chimiques : point de fusion, propriétés magnétiques, électriques, optiques, etc. La variation peut parfois être brutale comme le superparamagnétisme.

I.B.1. Effets de surface dominants

Une conséquence directe de la réduction de la taille est l'augmentation du ratio surface/volume. Plus un objet est petit, plus sa surface externe est importante par rapport à son volume.³ Une sphère solide d'argent pesant 10 g possède une surface externe d'environ 5 cm², alors que pour la même masse, des nanoparticules de 10 nm de diamètre totalisent une surface externe de pratiquement 600 m², soit une augmentation de la surface d'échange d'un facteur de 106. Un microcristal (1µm) de fer présente moins de 1% de ses atomes à la surface, alors qu'un nanocristal (1nm) en possède plus de 90% à sa surface.⁴ Par conséquent, la surface spécifique (surface externe par unité de masse), qui est la surface réelle d'échange, est plus grande pour les nano-objets.

Les nanomatériaux sont souvent caractérisés par un cœur cristallisé et ordonné, avec une surface désordonnée localement, voire amorphe. Comme la proportion d'atomes à la surface d'un nano-objet est importante, le réseau cristallin subit des contraintes qui conduisent à des déformations et des réarrangements d'atomes. Cette configuration modifie donc les phénomènes se produisant au niveau de la surface externe, notamment l'adsorption, l'absorption et la fixation d'espèces chimiques extérieures. Cette réactivité chimique particulière des nanoparticules est d'ailleurs largement exploitée dans la catalyse chimique et également dans les applications biologiques.

I.B.2. Agglomération et agrégation

L'instabilité thermodynamique de la surface des nano-objets rend ces dernières très réactives. L'énergie de surface élevée et la haute dispersion intrinsèques des nanoparticules contribuent aux phénomènes d'agglomération et d'agrégation souvent observés pour ces matériaux.^{5a, 5b-d} De tels comportements ont été bien connus et étudiés surtout dans le domaine des colloïdes.

L'agglomérat est une association de particules liées par des forces faibles (Van der Waals, électrostatiques ou tension superficielle), les particules étant adjacentes entre elles. La morphologie des agglomérats n'est pas une propriété du nanomatériau mais le fruit d'un état temporaire d'équilibre dynamique entre les effets de dispersion et d'agglomération dans une suspension ou un aérosol.

L'agrégat quant à lui est une nanoparticule hétérogène dans laquelle les différents constituants sont reliés par des liaisons fortes (type covalente). Il peut être le fruit d'une fusion entre plusieurs nanoparticules primaires ; le régime d'agrégation conditionne la forme finale de l'agrégat (compacité, dimensions...) et son interaction avec le milieu dans lequel il se trouve (ex. : pénétration

dans le système respiratoire et dans les cellules). L'ensemble de ces informations peut se révéler déterminant dans l'évaluation biologique des dispositifs contenant des nanomatériaux.⁶

I.B.3. Effets de taille sur les propriétés thermodynamiques

Avec la diminution de la taille, si celle-ci est en dessous du germe critique, le cristal devient instable. Il se produit alors soit un changement de structure cristallographique, soit un accroissement du volume.⁷ L'augmentation du rapport surface/volume entraîne l'apparition d'une pression vers l'intérieur de la sphère et induit des changements des propriétés thermodynamiques du matériau comme un abaissement du point de fusion, une diminution de la chaleur latente et un élargissement du domaine de coexistence des phases. Afin de minimiser l'énergie totale, on peut observer une baisse de la température de changement de phase solide-liquide avec la taille.⁸ Par exemple, la température de fusion de l'or passe de 1000°C environ pour des nanoparticules de 10 nm, à environ 500°C pour des nanoparticules de 2 nm. Cette chute est particulièrement abrupte pour les nanoparticules plus petites que 5 nm. Cependant, pour les nanoparticules incorporées dans une matrice, le point de fusion peut augmenter ou baisser selon la force d'interaction entre les nanoparticules et la matrice.

I.B.4. Effets de taille sur les propriétés mécaniques

Dans certains cas, la diminution de la taille des grains peut conduire à des produits allégés en masse tout en conservant les mêmes propriétés physiques et mécaniques par rapport aux matériaux conventionnels massifs, voire en les améliorant.⁹ Par exemple, le cuivre formé de nanocristaux de 6 nm est cinq fois plus résistant aux déformations mécaniques que des microcristaux de 50 µm, car la faible taille limite les imperfections structurales internes (dislocations, impuretés...)¹⁰

Historiquement, les matériaux nanostructurés ont été utilisés depuis des siècles, mais leur développement a connu un tournant à partir des années 1980, grâce aux microscopes qui permettent de révéler les microstructures fines. Le développement industriel et médical autour des métaux nanostructurés se porte essentiellement sur le cuivre, le nickel, le zinc, l'aluminium, le fer, l'argent, l'or et le titane.

Si ces métaux gagnent en résistance à l'usure mécanique, en dureté et en rigidité grâce aux nanostructures ; en revanche, ils perdent souvent en ductilité (capacité à tolérer des déformations sans se rompre).⁹ Or d'après la loi Hall-Petch appliquée aux matériaux conventionnels, la contrainte à partir de laquelle un matériau cristallin se déforme de manière irréversible est inversement proportionnelle à la taille des grains : plus les grains sont petits, plus le matériau peut se déformer, grâce aux phénomènes de dislocation (déplacement d'infimes défauts de sa structure cristalline). Cependant, il a été remarqué que certains matériaux nanocristallins avaient des comportements mécaniques qui dévient de cette relation, voire présentent un effet Hall-Petch négatif. En effet, au-dessous d'une trentaine de nanomètres, le volume des joints de grains n'est plus négligeable et

d'autres phénomènes physiques se déroulant dans l'espace intergranulaire deviennent prédominants, aux dépens des dislocations.

I.B.5. Effets quantiques

Lorsque les dimensions des nanomatériaux deviennent comparables à une grandeur physique caractéristique du système, par exemple le rayon de Bohr de l'exciton (distance entre l'électron et son trou), la longueur d'onde des électrons au niveau de Fermi ou la longueur d'échange dans les matériaux magnétiques, leurs propriétés physico-chimiques individuelles (électriques, optiques et magnétiques) sont radicalement différentes de celles du matériau massif. Des phénomènes quantiques apparaissent et sont prédominants principalement pour des tailles au dessous d'une dizaine de nanomètres.^{8, 11}

En particulier, pour des systèmes avec des électrons délocalisés comme les métaux ou les semi-conducteurs, le mouvement des excitons peut se trouver tellement confiné que les bandes d'énergie disparaissent au profit de niveaux d'énergie discrets donnant lieu à des propriétés quantiques.¹² C'est typiquement le cas des *quantum dots* (points quantiques), où le mouvement des électrons dans les trois dimensions est restreint par le confinement quantique.

Les propriétés quantiques dépendent de la taille du matériau au sein de l'échelle nanométrique. Sous les rayons ultra-violet (UV), les *quantum dots* de sélénure de cadmium changent de couleur en fonction de leur dimension : les grains verts pour 3 nm passent au jaune pour 4 nm, puis au rouge pour 5 nm.⁸ Les propriétés optiques de ces nanocristaux peuvent être exploitées dans des applications d'imagerie médicale. Leur avantage par rapport aux molécules fluorescentes est multiple : plus brillants et plus stables pour une imagerie dynamique, un spectre large permettant l'excitation par une grande variété de sources, des raies de fluorescence ajustables en fonction de la taille des nanocristaux, etc.

Lorsque les éléments magnétiques sont suffisamment petits (inférieurs à environ 15 nm), on observe une transformation d'un comportement ferromagnétique en superparamagnétique.¹³ La structure multi-domaines (domaines de "Weiss") qui caractérise les aimants et qui permet de minimiser l'énergie magnétique globale est incapable de se former. La nanoparticule devient donc monodomaine, c'est-à-dire que les spins portés par les atomes constitutifs de cette nanoparticule sont orientés dans une même direction. Un moment magnétique permanent apparaît et la nanoparticule peut être considérée alors comme un monodomaine magnétique. Un champ magnétique extérieur peut aligner les moments portés par une distribution de nanoparticules, augmentant de façon considérable le champ magnétique global et la viscosité du milieu en quelques millisecondes. Lorsque ce champ s'annule, l'agitation thermique redistribue, de manière aléatoire, l'ensemble de ces moments magnétiques sans aucune rétention de magnétisme.¹⁴ Le comportement est alors similaire au paramagnétisme des atomes mais le moment porté par les nanoparticules est beaucoup plus grand que le spin atomique, d'où le nom de superparamagnétisme. Cette propriété magnétique unique a permis par exemple le développement des SPIO (*Super Paramagnetic Iron Oxide* ou Oxyde de Fer

Super Paramagnétique) pour des applications médicales comme le traitement par hyperthermie,¹⁵ l'imagerie ou le diagnostic.

I.B.6. Effets de la structure cristalline

Si des nanoparticules ou des nanocomposites sont incorporés dans un matériau pour le renforcer et ne sont que des accessoires, d'autres matériaux exhibent des propriétés mécaniques et chimiques intrinsèques intéressantes. Faisant partie de la famille des fullerènes, les **nanotubes de carbone** ont des propriétés qui n'existent pas dans la nature : 100 fois plus résistants et 6 fois plus légers que l'acier, plus durs que le diamant. Dotés d'une excellente stabilité thermique et chimique, certains nanotubes sont même conducteurs ou semi-conducteurs. Ces nanomatériaux tubulaires sont formés d'atomes de carbone disposés en structure régulière type graphène. La forme la plus simple est le SWCNT (*Single-walled carbon nanotubes* ou nanotubes de carbone mono-feuillet), consistant en un seul feuillet enroulé d'un diamètre d'environ 0,4 nm et d'une longueur pouvant atteindre le micromètre. Sous une forme plus complexe, ces nanotubes sont formés de cylindres multiconcentriques de carbone d'un diamètre compris entre 2 et 100 nm (*Multi-walled carbon nanotubes*, nanotubes de carbone mono-feuillet ou MWCNT).

I.B.7. Echelle nanométrique et échelle biologique

Afin d'améliorer l'interaction des matériaux avec les milieux biologiques pour des applications médicales, on cherche de plus en plus à mimer les systèmes biologiques en nanostructurant le matériau. La dimension nanométrique des particules minérales naturelles garantirait une robustesse optimale du matériau et s'accommoderait au mieux des défauts naturels.¹⁶

En effet, la nature semble tirer profit des structures nanométriques pour produire des systèmes biologiques performants. Un bon exemple est la composition de l'os naturel, qui est souvent décrit schématiquement comme un composite d'origine biologique à renforts fibrillaires, dans lequel des inclusions solides de 10 à 50 nm sont intégrées dans une matrice protéinique molle. De composition minérale proche de l'os naturel (calcium et phosphate), l'hydroxyapatite synthétique, souvent utilisée comme substitut osseux, possède une excellente ostéoconduction (propriété passive du matériau à recevoir la repousse osseuse) à l'échelle macroscopique. Toutefois, elle ne peut être complètement résorbée, surtout si elle est fortement cristallisée et pure et reste donc à long terme dans l'organisme en tant qu'implant. L'abaissement de la taille des particules d'hydroxyapatite à l'échelle nanométrique a pour conséquence de rendre ces nanoparticules synthétiques biorésorbables.¹⁷

De plus, comme vu précédemment, plus il y a d'atomes à la surface exposée, plus la surface d'échange avec les éléments extérieurs est grande. Cette particularité des nanomatériaux se révèle

fort utile pour des applications biologiques. En effet, lorsqu'on introduit un matériau dans un milieu biologique, la première étape est l'adsorption rapide des protéines du sérum ou de tout autre environnement biologique sur la surface du matériau. Ces protéines vont alors adopter des conformations différentes selon des propriétés physico-chimiques de la surface (ex. : hydrophobie, rugosité, topographie, réactivité chimique...). Le type, la quantité et la conformation adoptée par les protéines plasmatiques déterminent ensuite leurs interactions avec les récepteurs des membranes cellulaires, permettant ainsi l'adhésion et la prolifération ou non des cellules à la surface du matériau.^{18a, 18b}

L'interaction entre les protéines et les nanomatériaux devrait être influencée uniquement par les propriétés surfaciques uniques intrinsèques aux nano-objets, comme une surface spécifique plus importante, une rugosité ou une topographie finement structurées, des distributions électroniques modifiées... Une telle surface pourrait par exemple fournir une plus grande quantité de sites disponibles pour l'adsorption des protéines et favoriser l'adhésion et la prolifération des cellules. Ainsi, il a été montré que les surfaces de titane nanostructurées des implants orthopédiques augmentent significativement l'adhésion des ostéoblastes par rapport aux surfaces non traitées.^{18b, 19, 20, 21}

Certains auteurs émettent l'hypothèse que l'augmentation de colonisation des surfaces nanostructurées par les ostéoblastes serait due à la similitude entre les dimensions nanométriques de ces nanomatériaux et la taille des protéines.^{20, 21} Il a été montré que la vitronectine, une protéine spécifique du sérum, qui s'adsorbe plus sur des céramiques nanostructurées que des céramiques conventionnelles, favorise l'adhésion des ostéoblastes.^{18a} Le même comportement a été remarqué avec la fibronectine, une autre protéine du plasma sanguin et de la matrice extracellulaire qui favorise également la prolifération des ostéoblastes.²⁰ Ainsi, les céramiques nanoporeuses présentent une meilleure biocompatibilité que les céramiques classiques. Une observation similaire a été également faite avec des métaux, des polymères et des composites nanostructurés. Webster *et al.* vont même plus loin, en postulant que la topographie de dimension nanométrique d'une surface est suffisante pour favoriser l'adhésion des ostéoblastes, indépendamment de la chimie de surface.²¹

Les nanomatériaux exhibent des propriétés uniques qui peuvent être mises à profit dans le domaine de la santé. Les matériaux synthétiques, mimant de mieux en mieux les systèmes biologiques jusqu'aux détails nanométriques, permettraient d'améliorer leur biocompatibilité. De plus, compte-tenu de leur taille, des nanoparticules devraient pouvoir circuler et pénétrer dans nombre de cellules, atteignant éventuellement de manière ciblée des endroits de l'organisme, même s'ils sont réputés difficiles d'accès avec les technologies actuelles. Néanmoins, les nanoparticules demeurent des corps étrangers susceptibles d'être traités comme tels et éliminés par les mécanismes de protection de l'organisme. Les nanotechnologies offrent l'espoir d'une médecine idéale et personnalisée : des nanosondes intelligentes et multifonctionnelles seraient capables de détecter très tôt les cellules anormales à l'origine du développement des maladies, détruire ces cellules ou dispenser au moment voulu la dose exacte du médicament approprié au patient, voire de transmettre

les données médicales en temps réel au médecin pour une surveillance au plus près de l'évolution de la maladie.

I.C. Dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux

La nanomédecine est une des applications des nanotechnologies les plus prometteuses. Elle exploite dans le domaine de la santé, les nouvelles propriétés physiques, chimiques et biologiques liées à une structuration à l'échelle nanométrique des nanomatériaux. Nous nous intéressons dans ce rapport spécifiquement aux dispositifs médicaux. La directive 93/42/CEE consolidée²² définit un « dispositif médical comme tout instrument, appareil, équipement, logiciel, matière ou autre article, utilisé seul ou en association, ainsi que tout accessoire, y compris le logiciel destiné par le fabricant à être utilisé spécifiquement à des fins diagnostiques et/ou thérapeutiques, et nécessaire pour le bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins de :

- diagnostic, prévention, contrôle, traitement ou atténuation d'une maladie,
 - diagnostic, contrôle, traitement, atténuation ou compensation d'une blessure ou d'un handicap,
 - étude ou remplacement ou modification de l'anatomie ou d'un processus physiologique,
 - maîtrise de la conception,
- et dont l'action principale voulue dans ou sur le corps humain n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens. »

A titre d'exemple, on peut citer des fils de suture, des seringues, des prothèses de hanche, des cœurs artificiels, des hémodialyseurs, des scanners, des pacemakers, des réactifs de laboratoires, etc.

Dans cette partie, des exemples d'applications médicales sont détaillés, afin d'avoir une idée de l'utilisation des nanomatériaux dans les dispositifs médicaux déjà commercialisés ou en cours de développement. Ils sont aussi présentés dans l'Annexe II de ce rapport. Cet état des lieux n'a pas l'ambition d'être un inventaire exhaustif, mais désire montrer que les nanotechnologies dans le cas des dispositifs médicaux touchent un large spectre d'applications médicales, allant du matériel médical traditionnel à des appareils électroniques biomimétiques sophistiqués, en passant par des implants orthopédiques, dentaires ou cardiovasculaires.²³ Nous nous limitons aux dispositifs médicaux et n'aborderons pas les applications dans la vectorisation des médicaments (ex. des nanoparticules de polymère) ou les agents de contraste en imagerie médicale qui ne sont pas des dispositifs médicaux.

I.C.1. Matériel médical

Une meilleure résistance et robustesse des matériaux grâce à la nanostructure séduisent nombre d'industriels, qui y voient des constituants intéressants pour l'industrie aérospatiale, l'armement, l'équipement sportif ou pour les dispositifs médicaux.

• *Aiguilles pour injection intradermique, sous-cutanée*

Les fabricants ont innové ces dernières décennies pour améliorer les dispositifs médicaux d'administration de médicaments. Bénéficiant des techniques de miniaturisation développées en électronique, la taille des aiguilles hypodermiques a ainsi considérablement diminué, atteignant maintenant le micromètre. Les micro-aiguilles sont conçues pour être les plus petites et les plus aiguisées possibles. L'objectif est qu'elles pénètrent peu en profondeur dans la peau, avec pour conséquence une diminution des lésions tissulaires et de la sensation de douleur.

Souvent constituée de métal (nickel, titane, or...), silicone ou polymères biodégradables, cette nouvelle génération de systèmes d'injection se présente sous la forme d'une matrice de micro-aiguilles, ne faisant que quelques centaines de micromètres de longueur et dont le diamètre de la pointe peut être submicronique. De part leur dimension légèrement supérieure à l'échelle nanométrique, ces systèmes d'injection ne font pas partie à proprement parler des nanotechnologies. Néanmoins, ces dispositifs sont utiles pour administrer des micro- ou nano-doses de médicaments, d'insuline ou de vaccins, en transdermique ou même dans la cornée. Leurs applications pourraient s'étendre aussi aux systèmes de diagnostic et de surveillance des paramètres biologiques du patient.

Les dispositifs en phase de commercialisation ou en développement avancé sont par exemple MicroPyramid™ de NANOPASS TECHNOLOGIES (Israël) pour l'injection de vaccins et d'insuline, MicroTrans™ de VALERITAS (USA), Macroflux™ de ZOSANO PHARMA (USA), NanoJect™ de DEBIOTECH (Suisse), Pyraderm™ d'APOGEE TECHNOLOGY (USA). Les fabricants plutôt intéressés par des dispositifs pour la surveillance et le diagnostic sont, entre autres, KUMETRIX (USA) pour la mesure du taux de glucose chez les diabétiques et MICRONIT MICROFLUIDICS (Pays-Bas).

• *Soins des plaies*

À l'époque du médecin grec Hippocrate, l'argent était utilisé pour ses propriétés germicides. Le nitrate d'argent entrainait dans la composition de nombreux traitements dont les maladies infectieuses, avant d'être supplanté par des **particules d'argent** métalliques colloïdaux à la fin du XIX^e siècle. La découverte des antibiotiques dont la pénicilline fit tomber l'argent dans l'oubli, avant que ce dernier ne renoue de nouveau avec le succès ces vingt dernières années en raison de son large spectre d'activité antimicrobienne, antifongique et antivirale offrant une alternative aux antibiotiques. On trouve de l'argent dans des gels, crèmes, poudres ou émulsions, mais surtout dans des pansements. Utilisés sur des plaies graves comme des brûlures, ces pansements diffèrent par la composition, la vitesse de libération et le mode d'action de l'entité active.²⁴

Le mécanisme d'action exact de l'argent est à ce jour encore mal connu ; on remarque qu'à la fois les ions d'argent et les nanoparticules d'argent métallique ont des actions antimicrobiennes en milieu aqueux.^{25a, 25b} Des éléments plus précis sur le mécanisme d'action et la toxicité sont développés dans la partie II.B.2. de ce rapport.

Les premiers pansements à base d'argent contiennent des sels d'argent (ex : Actisorb™ de SYSTAGENIX - USA, Arglaes™ et SilvaSorb® de MEDLINE INDUSTRIES - USA, Urgotul SSD® des LABORATOIRES URGO - France), mais peu de pansements avec des nanocristaux d'argent métallique sont commercialisés. Les pansements contenant des nanoparticules d'argent métallique les plus connus sont Silverlon™ d'ARGENTUM MEDICAL (USA) et Acticoat® de SMITH & NEPHEW (Royaume-Uni). Le contact du pansement avec de l'eau stérile ou l'exsudat permettrait la solubilisation et/ou l'ionisation de l'argent métallique. Indiqué pour des plaies graves, Acticoat® utilise la technologie Silcryst™. L'avantage de la forme métallique par rapport au sel d'argent serait la vitesse de libération du principe actif plus rapide^{26 2728} et plus soutenue. A titre de comparaison, le nitrate d'argent est tout de suite libéré en milieu biologique et son efficacité ne dure que 2 heures, alors que l'Acticoat™ reste efficace jusqu'à 7 jours.²⁹ En présence d'un milieu aqueux (ex. : plaie), pour Silverlon™, toutes les nanoparticules d'argent métallique seraient hydrolysées sous forme d'ions Ag^+ , alors que le pansement Acticoat® relarguerait l'argent sous forme Ag^+ et Ag^0 . Afin d'expliquer la longue durée d'efficacité d'Acticoat, Dunn *et al.* ont émis l'hypothèse que l'argent sous forme Ag^0 serait moins rapidement désactivé par les contre-ions chlorure ou par des particules organiques du milieu biologique que les ions Ag^+ .²⁹

● **Textiles médicaux**

L'usage de l'argent en tant qu'agent antimicrobien s'est également étendu aux textiles et autres équipements médicaux nécessaires dans des environnements à atmosphère contrôlée comme les salles opératoires : masques, blouses, bandages... Les nanoparticules d'argent peuvent être incorporées dans les fibres de textile par immersion dans une solution colloïdale d'argent, ou par fonte-tissage du polymère avec des nanoparticules d'argent ou encore par pulvérisation des nanoparticules. Cependant, pour être efficaces, il faut que les particules d'argent soient présentes à la surface des fibres et l'efficacité peut diminuer au fil des lavages. On trouve des masques chirurgicaux contenant des nanoparticules d'argent NanoFense™ commercialisés par APPLIED NANOSCIENCE (USA) filtrant des virus grippaux ou d'autres masques fabriqués par SCOUTBURG (Taiwan). Le fabricant coréen HYOSUNG propose des textiles à effet antimicrobien permanent sous le nom de Mipan® Magic Silver Nano. De manière générale, il est difficile d'identifier la forme de l'argent dans ces produits (métallique ou ionique, nanoparticule ou revêtement nano ou micrométrique ?).

Les propriétés d'autres oxydes de métaux sont aussi exploitées. Les nanoparticules d'oxyde de magnésium présenteraient aussi des activités antibactériennes.³⁰ C'est pourquoi elles sont intégrées dans le système de filtration du masque NanoMask® du fabricant EMERGENCY FILTRATION PRODUCTS (USA), qui arrêterait les contaminants viraux et bactériens.

● **Nanosondes et nanorobots en développement**

Des projets de dispositifs médicaux invasifs actifs nanométriques en ébauche font appel à des capteurs ultra-sensibles,³¹ des moteurs et générateurs autonomes,³² des bras pour manipuler avec précision et des ordinateurs moléculaires. Les composants de ces dispositifs seraient biocompatibles et même biorésorbables.³³ Ces nanorobots seraient capables de sonder l'organisme et les cellules à la recherche d'éventuelles maladies, d'éliminer ou réparer directement les cellules malades tout en préservant les cellules saines (théranostique).³⁴ La médecine passerait ainsi de l'échelle macroscopique à celle micro/nanoscopique des systèmes biologiques.³⁵ Cependant, ces dispositifs sont extrêmement complexes à mettre au point et demeurent encore à l'état de concept.

I.C.2. Produits dentaires et orthopédiques

Le marché des implants orthopédiques et dentaires est en pleine expansion, notamment en raison du vieillissement de la population. Les matériaux utilisés pour fabriquer des implants peuvent être répartis en quatre catégories : les métaux, les céramiques, les polymères et les composites.

• *Composites pour restauration dentaire*

Un composite de restauration dentaire contient généralement une résine photopolymérisable, des charges particulières de renfort, des additifs et des pigments de couleur. Les résines sont classiquement des polymères de type *bis*-GMA, TEDMA et TEGDMA, de viscosité résultante variable. Les charges de renforcement sont constituées de particules très fines, de tailles différentes comprises entre 0,01 et 50 µm, pour augmenter les propriétés mécaniques du composite. En effet, une bonne distribution de taille des particules permettrait une optimisation de l'occupation de l'espace, empêchant la contraction des polymères du composite, qui peut atteindre jusqu'à 20% du volume.³⁶ Les plus grosses particules proviennent des cristaux de quartz broyés et les plus fines sont des nanoparticules de 10-100 nm, faites souvent en oxydes de silicium ou de zirconium.

L'utilisation des nanoparticules comme charges particulières de renfort a été amorcée en 1950 avec la commercialisation d'une gamme de poudres Aerosil[®] par DEGUSSA (Allemagne). Ces nanoparticules ont tendance à s'agglomérer. C'est pourquoi, depuis les années 2000, les fabricants ont chacun développé une méthodologie pour emprisonner ces nanoparticules dans une matrice de polymère, afin de les isoler les unes des autres et obtenir une meilleure distribution des tailles. D'après ces industriels, l'avantage de ces nanoparticules par rapport aux agrégats des poudres Aerosil[®] serait un meilleur taux de charge et une légère amélioration des propriétés mécaniques et rhéologiques.

On trouve un certain nombre de composites pour restauration dentaire contenant des nanoparticules. Le fabricant 3M ESPE (USA) possède plusieurs gammes de produits dentaires, allant des nanocomposites de restauration photopolymérisable Filtek[™] Supreme, au système adhésif auto-mordant Adper[™] Scotchbond[™] SE contenant des nano-charges de zircone silanisées, en passant par le matériau nano-ionomère Ketac[™] N100. En France, d'autres composites sont

commercialisés, comme le Kappalux Nano des PRODUITS DENTAIRE PIERRE ROLLAND (France). On rencontre également des produits de restauration dentaire allemands, à l'instar du Grandio® de VOCO (Allemagne) ou japonais, comme l'Optiglaze de GC CORPORATION (Japon).

• **Produits pour comblement osseux**

Les produits de substitut osseux ont souvent des indications à la fois en chirurgie orthopédique et dentaire. La phase minérale naturelle de l'os et des dents étant composée de calcium et de phosphate, des matériaux synthétiques de composition chimique similaire sont proposés, tels que l'hydroxyapatite ($[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$) et le phosphate de calcium ($[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$).

Des études ont montré que ces nanoparticules forment une couche minérale qui favoriserait la réparation de l'émail dentaire, mais pourraient aussi avoir un effet antibactérien à la surface dentaire.³⁷ Ainsi, des produits dentaires comme des dentifrices ou des rince-bouches, qui ne sont pas forcément des dispositifs médicaux, contiennent des nanoparticules.

En orthopédie, lorsqu'un apport de tissus osseux est nécessaire, la greffe d'os autologue est la technique de référence. Lorsque celle-ci est insuffisante qualitativement ou quantitativement, des substituts synthétiques de l'os sont utilisés en alternative ou en association avec l'autogreffe. Leur utilisation permet de diminuer ou d'éviter les risques de morbidité liés au prélèvement osseux autologue, essentiellement d'origine iliaque. L'hydroxyapatite faiblement cristallisée et le phosphate de calcium (β -TCP) favorisent la repousse osseuse en apportant *in situ* la matière première pour la reconstruction de l'os naturel. Les nanoparticules de β -TCP et d'hydroxyapatite faiblement cristallisées sont facilement résorbables, contrairement à l'hydroxyapatite fortement cristallisée et pure.

Le gel d'hydroxyapatite est un mélange faiblement cristallisé de nanocristaux d'hydroxyapatite et d'eau. La surface spécifique du matériau est augmentée, grâce à la forme nanocristalline : 100 m²/g contre 1 m²/g pour une poudre d'hydroxyapatite synthétique classique. Ainsi, au niveau clinique, le contact avec le tissu receveur serait plus important et augmenterait ainsi la réactivité et la vitesse de résorption.

Parmi les produits commercialisés à base d'hydroxyapatite nanoparticulaire, il existe des gels injectables pour comblement osseux Nanogel® de TEKNIMED (France) et Nanostim™ encore commercialisé sous le nom de Ostim® de AAP BIOMATERIALS (Allemagne) distribué par MEDTRONIC en France. Ces gels ne possèdent pas de propriétés mécaniques, car ils ne durcissent pas. S'ils sont utilisés dans une zone de stabilité osseuse, il faut alors ajouter des procédés traditionnels d'ostéosynthèse. De même, le substitut osseux PerOssa® d'AAP BIOMATERIALS (Allemagne) est fabriqué à partir de nanocristaux d'hydroxyapatite tels que ceux utilisés dans le Nanostim®. Par contre, le produit de greffe d'os FortrOss® de PIONEER SURGICAL TECHNOLOGY (USA) combine les nanoparticules d'hydroxyapatite de la technologie NanOss® avec la matrice ostéoconductive E-Matrix. D'autres produits sont plutôt à base de phosphate de calcium comme le matériau de comblement de l'os spongieux Vitoss® Scaffold d'ORTHOVITA (USA). La porosité

nanométrique de ce dernier assurerait un remodelage rapide de l'os. Tous ces produits ont des indications à la fois en chirurgie orthopédique et dentaire.

L'utilisation de nanoparticules d'argent aux propriétés antimicrobiennes dans des ciments osseux sont aussi à l'étude.³⁸

• **Implants métalliques nanostructurés**

Les implants sont posés pour une durée potentiellement longue, mais malgré tout limitée. Les prothèses de hanche ont par exemple une durée de vie d'environ 10-15 ans.²⁰ Les alliages métalliques sont choisis pour leurs bonnes propriétés mécaniques et leur résistance à la corrosion. Cependant, des descellements progressifs des implants avec l'os naturel ont été observés, particulièrement lorsqu'ils sont cimentés. Ces complications, nécessitant une ré-intervention chirurgicale, ont été souvent attribuées aux défauts d'interface implant/os naturel.

Pour améliorer l'intégration de l'implant dans l'os, les matériaux peuvent subir un traitement de surface, soit chimique, soit topographique. L'objectif est d'induire une formation des tissus rapide, guidée et contrôlée autour de la prothèse orthopédique ou de l'implant dentaire. La matrice extracellulaire formée aurait idéalement la composition, la structure et les propriétés biomécaniques les plus proches possibles de celles de l'os natif, afin d'assurer un ancrage stable des matériaux prothétiques.

Nous avons vu précédemment que des surfaces nanostructurées mimant la structure nanométrique de l'os naturel permettent de favoriser l'adhésion et la différenciation des cellules osseuses *in vitro*. Ainsi, SYBRON IMPLANT SOLUTIONS (USA) propose des implants constitués de titane pur, sans contamination chimique, mais qui auraient une bonne ostéointégration grâce à la topographie nanométrique de la surface nanoporeuse Puretex[®]. De même, l'implant dentaire NanoImplant[®] de TIMPLANT (République Tchèque), en titane nanostructuré, apporterait des avantages mécaniques et une colonisation plus rapide par les fibroblastes.

Si pour certains, la topographie nanométrique de la surface d'un implant est un critère suffisant pour favoriser la prolifération des ostéoblastes et donc la reminéralisation de l'os,²¹ d'autres chercheurs ont tenté de développer des implants avec des surfaces nanométriques bioactives pour promouvoir l'adhésion cellulaire et la croissance osseuse. Des revêtements en hydroxyapatite ou en phosphate de calcium contribueraient à la recalcification de l'os naturel autour de l'implant, à la fois grâce à la topographie nanométrique et au réservoir de matière première. C'est le choix du fabricant DOT (Allemagne) qui commercialise le revêtement microporeux Bonit[®], composé de nanocristaux d'hydroxyapatite. Ce revêtement est par exemple utilisé dans les prothèses orthopédiques Nanos[™] commercialisées par SMITH&NEPHEW (Royaume-Uni) et dans les prothèses articulaires Symax[™] de STRYKER (France). Les implants NanoTite[™] de BIOMET 3i contiennent, eux, des nanocristaux de phosphate de calcium.

Des études sont menées sur l'intérêt que pourrait apporter dans le domaine médical différents revêtements, qu'ils soient en céramique nanoporeux (ex. : Debiostent[™] en développement chez DEBIOTECH, Suisse), qu'ils incorporent des nanoparticules d'argent pour leurs propriétés

antiseptiques ou qu'ils soient constitués de polymères biomimétiques en structure ou/et incorporant des protéines.

- **Prothèse externe de genou**

Les avancées en technologie prothétique concernent aussi la bionique avec des améliorations significatives des prothèses externes de genou, en termes de mobilité, d'efficacité énergétique et de démarche naturelle. Le genou monoaxial Rheo Knee d'OSSUR (Islande) permet au patient amputé d'avoir des amplitudes articulaires souples et naturelles grâce à un contrôle fin via le fluide magnéto-rhéologique. Extérieur au corps du patient, ce fluide comporte des particules de fer de 100 nm à 1 µm dans une huile, qui réagissent instantanément au champ magnétique appliqué en fonction du mouvement voulu. Les particules s'organisent alors en chaîne, opposant une résistance minimale pour donner de la fluidité et de la souplesse à la démarche.

I.C.3. Dispositifs cardiovasculaires

- **Stents**

L'insuffisance coronarienne, liée à des rétrécissements du réseau vasculaire (sténoses), peut être traitée en pratiquant une angioplastie coronaire avec implantation d'un dispositif permettant de maintenir le vaisseau dilaté, appelé endoprothèse ou stent. Les stents coronaires sont souvent des structures métalliques ou de polymère. Il existe des stents nus et des stents incorporant des molécules bioactives (dit « actifs »). Malgré d'excellents résultats, une des principales complications de la technique est la resténose intra-stent. Elle survient essentiellement par une réaction d'hyperplasie intimale de cellules musculaires lisses dans la paroi du vaisseau sanguin et un dépôt d'une matrice extracellulaire.³⁹ Les stents nus métalliques sont aussi associés au risque de développer des thromboses. La recherche actuelle tente donc de trouver des solutions plus efficaces et de plus longue durée.

On peut tout d'abord chercher à diminuer le risque thrombotique en modifiant le matériau utilisé.⁴⁰ Ainsi, des fabricants ont cherché à corriger le défaut de contact entre le stent et les cellules en proposant des revêtements nanométriques en polymère ou en céramique nanoporeux sur stent nu (ex. : ALCOVE SURFACE, Allemagne). CELONOVA BIOSCIENCES (Canada) optimise son stent coronaire Catania™, fait en alliage de cobalt et de chrome, en le recouvrant d'un revêtement d'une cinquantaine de nanomètres de polymère Polyzene®-F. La surface du stent traitée par Polyzene®-F serait hémocompatible et favoriserait une cicatrisation rapide et totale des vaisseaux. Elle permettrait aussi de réduire l'activation plaquettaire péri- et post-opératoire et contribuerait à empêcher les réactions inflammatoires des tissus à l'origine de la resténose.

Parmi les stents actifs, pour lesquels on cherche à diminuer le risque de resténose, le stent VestaSync™ de MIV THERAPEUTICS (Canada) possède un revêtement ultrafin en hydroxyapatite, avec une porosité de 100-500 nm, contre 14-15 µm dans les revêtements poreux conventionnels.⁴¹ Le

fabricant engage actuellement des études cliniques (en fin de phase II à ce jour) pour évaluer l'efficacité du dispositif en vue d'obtenir un marquage CE.

• **Cathéters**

Naturellement, l'idée d'incorporer des principes actifs ne s'applique pas uniquement aux stents, mais est également utilisée pour d'autres dispositifs médicaux. En particulier, le fabricant ACRYMED (USA) propose des revêtements incorporant des nanoparticules d'argent (technologie SilvaGard™). Il a été intégré dans le cathéter pour anesthésie ON-Q® SilverSoaker™ déjà commercialisé aux Etats-Unis. L'utilisation de nanoparticules d'argent aux propriétés antimicrobiennes pour d'autres dispositifs médicaux invasifs comme les cathéters veineux centraux sont en développement (en essai clinique).³⁸

Les procédures médicales, de plus en plus sophistiquées, requièrent souvent des dispositifs et des outils adaptés, comme par exemple des cathéters ou des ballonnets aux parois ultrafines et lisses. Les renforts conventionnels des matériaux sont trop volumineux pour permettre la fabrication des objets aussi fins. Il s'agirait donc de trouver des renforts de plus petites tailles : des nanoparticules d'argile, de céramique, de silice ou des nanotubes de carbone. Ces nanorenforts incorporés dans une matrice de polymère apporteraient aux nanocomposites de polymère des propriétés mécaniques améliorées,⁴² dont une plus grande rigidité sans qu'il y ait friabilité, comme il est nécessaire dans les cathéters.

• **Greffons vasculaires synthétiques**

L'électrofilage (*electrospinning*) est un procédé de création des nano ou micro-fibres de polymère en utilisant les forces électrostatiques pour obtenir des « textiles » innovants. Lorsque la tension électrique appliquée entre la buse de filage et une contre-électrode est suffisamment élevée, la solution de polymère est étirée et forme un jet très fin vers la contre-électrode. Les applications de ce domaine de recherche sont entre autres des implants ou la médecine régénérative.⁴³ Les possibilités sont nombreuses, car on peut faire varier la taille et le nombre de pores, incorporer des molécules bioactives ou des nanoparticules dans le matériau final, en jouant sur la solution de polymère ou la contre-électrode, qui peut être liquide. La densité du « textile » final peut être modulée pour mimer la structure tissulaire humaine, avec des applications implantables pour l'os, le cartilage et le système vasculaire.

Le fabricant NICAST (Israël) a obtenu le marquage CE en 2008 pour un greffon d'accès vasculaire auto-obturateur AVflo™, fait en textile électrofilé. Il devrait lancer cette année sur le marché européen une version perfectionnée du greffon et un treillis herniaire intra-abdominal NovaMesh™, aussi constitué de nanotissu de polymère électrofilé.

D'autres chercheurs développent également des artères artificielles avec des matériaux de polymères nanométriques mimant les vaisseaux sanguins naturels. Une équipe anglaise est sur le point de mener des études cliniques avec un greffon vasculaire de polymère comportant à sa surface des nanocages d'UCL-NanoBio™, formant un nanocomposite de polymère breveté.⁴⁴ Ces nanocages stimuleraient la prolifération des cellules endothéliales circulantes, ce qui contribuerait à la réparation

du vaisseau sanguin endommagé. Une compagnie russe (ROSKARDIOINVEST) cherche à développer des valves cardiaques artificielles nanostructurées, qui seraient moins résistantes aux flux sanguins et diminueraient le risque de thromboses.

I.C.4. Chirurgie

• Instruments chirurgicaux

L'utilisation des nanotechnologies dans le domaine de la chirurgie vise essentiellement à rendre l'acte moins invasif. Pour ce faire, on peut tout d'abord améliorer les instruments et le matériel existants. Par exemple, l'incision faite par les scalpels à revêtement de diamant est plus fine et précise, grâce à un plus faible coefficient de friction. L'avantage de la couche nanométrique de diamant est sa faible adhérence physique aux matériaux et tissus pour une pénétration plus facile. Son inertie chimique et biologique assurerait une grande longévité au matériau. La rugosité de la surface de la lame commercialisée par GFD GESELLSCHAFT FÜR DIAMANTPRODUKTE MBH (Allemagne) n'est que de 20-40 nm environ. Ce type d'instruments chirurgicaux pourrait améliorer la chirurgie ophtalmologique ou la neurochirurgie.

D'autres fabricants cherchent à améliorer le matériau comme AB SANDVIK MATERIALS TECHNOLOGY (Suède) qui a développé un acier inoxydable contenant des nanocristaux de ce métal mesurant une dizaine de nanomètres. Ce nouveau métal est utilisé pour faire des aiguilles de suture par exemple (aiguilles Sandvik Bioline 1RK91™). Il combinerait une bonne résistance avec une bonne ductilité (diminution du risque de rupture de l'aiguille). Enfin, la recherche se penche aussi sur le développement de couteaux nanométriques en composé dur de silicium (20 nm de rayon de courbure) ou en nanotubes de carbone, capables de faire des ablations au niveau des cellules.⁴⁵

• Neurochirurgie

Des cathéters de drainage du liquide céphalo-rachidien, internes ou externes, peuvent être à l'origine d'infections bactériennes qui parfois se propagent rapidement dans le cerveau et autour des méninges. L'utilisation de cathéters imprégnés de nanoparticules d'argent permettrait d'éviter ces complications infectieuses.⁴⁶ Une étude clinique randomisée est attendue pour confirmer les résultats d'une étude pilote.

• Chirurgie de précision nanométrique

Grâce aux nanotechnologies, la chirurgie atteint désormais un niveau supplémentaire de précision.⁴⁷ Des lasers femtosecondes peuvent réaliser des chirurgies au niveau des cellules (par exemple sur des cellules neuronales) ou des chromosomes. Les rayons lasers peuvent aussi servir à piéger, mouvoir et manipuler des cellules, des organelles ou des molécules biologiques, protéines ou ADN. Sous l'action de la lumière laser, les groupes chimiques de ces nanopinces réagissent en fermant ou en ouvrant la pince qu'ils forment en absorbant des photons de différentes longueurs d'onde.

• **Nano-dispositifs chirurgicaux**

Les progrès de miniaturisation en électronique permettent d'envisager des améliorations dans le domaine médical, grâce notamment au développement des MEMS/NEMS (systèmes micro/nano-électromécaniques) de plus en plus sophistiqués. Des nano-outils seraient capables d'assister les chirurgiens, en permettant des manipulations au niveau nanométrique ou en fournissant des données biologiques grâce à des capteurs. Ces nano-outils seraient contrôlés par l'Homme à l'aide d'ordinateurs pour proposer et/ou effectuer une chirurgie la moins invasive possible. Par exemple, l'appareil chirurgical MAKO d'ORTHOSENSOR (USA) livre aux chirurgiens de l'Hopital Holy Cross aux Etats-Unis des données précises sur l'implantation orthopédique personnalisée du genou, grâce à ses nanocapteurs.

I.C.5. Nanotechnologies dans le traitement des cancers

Les traitements traditionnels contre les cancers sont la chirurgie, la chimiothérapie, l'immunothérapie et la radiothérapie. La thermothérapie est une alternative à ces traitements en cas d'échec ou en raison des effets secondaires. Cette technique consiste à chauffer les cellules tumorales, qui sont plus sensibles à la chaleur que les cellules saines.¹⁵ La chaleur est obtenue grâce à une source d'énergie externe, basée sur des micro-ondes, des ultra-sons, des appareils optiques ou un champ magnétique ou électrique créé entre des antennes. Le principal défaut des techniques d'hyperthermie classiques est l'hétérogénéité de la distribution de la chaleur dans les tissus, ce qui est à l'origine de nombreux effets secondaires.

L'utilisation de nanoparticules dans la thermothérapie des cancers semble apporter un réel bénéfice, grâce à la synergie avec certains traitements classiques. Cette technique est très performante pour détruire les tumeurs, tout en limitant les effets sur les organes et tissus sains. Ces nanoparticules permettraient le traitement de tumeurs dont la localisation ou la sévérité rend les traitements médicamenteux peu efficaces et la chirurgie délicate. A court terme, la durée de survie peut augmenter et les effets indésirables rester limités grâce à l'action localisée des nanoparticules. Actuellement, trois dispositifs de ce type sont les plus avancés dans le développement :

- la thérapie Nano-cancer de MAGFORCE NANOTECHNOLOGIES (Allemagne), qui vient d'obtenir le marquage CE en 2010,
- NanoXray de NANOBOTIX (France) qui s'apprête à passer en phase d'étude clinique,
- AuroShell de NANOSPECTRA BIOSCIENCES (USA) également en études cliniques.

Les nanoparticules de MAGFORCE NANOTECHNOLOGIES sont des oxydes de fer superparamagnétiques de 15 nm environ recouvertes d'aminosilanes et sont activables par un champ magnétique externe. Elles sont indiquées dans le glioblastome multiple,⁴⁸ mais le fabricant allemand cherche à étendre l'indication à d'autres types de cancer. Les nanoparticules de NANOBOTIX sont en oxyde d'hafnium et sont activées par rayons X pour des traitements de sarcomes des tissus mous aux extrémités. Quant aux nanoparticules de silice recouvertes d'or de NANOSPECTRA

BIOSCIENCES, elles ont 150 nm de diamètre. Elles sont activées par une lumière laser et pourraient être utilisées contre les tumeurs solides du cerveau et du cou.⁴⁹

Brachysil™ de PSIVIDA (Australie) est un dispositif médical en évaluation clinique pour le traitement du cancer de la prostate. Il contient plus précisément des microparticules de 30 µm de silicium mais avec des pores nanométriques nommées BioSilicon incorporant du phosphore radioactif ³²P. Ce traitement est conçu pour délivrer localement des doses ciblées de β-radiation, après la biodégradation de la coque en silicium.

Le système NanoKnife™ d'ANGIODYNAMICS (USA) est une nouvelle technique d'ablation de tumeurs reposant sur l'électroporation[†] irréversible de cellules cancéreuses (marquage CE obtenu en 2009). Des pulsations électriques sont créées entre des sondes positionnées au niveau de la lésion. Elles ont pour conséquence de provoquer des pores nanométriques dans les membranes cellulaires et de provoquer la mort de ces cellules.

D'autres dispositifs d'hyperthermie, faits de matériaux différents et/ou utilisant d'autres sources d'énergie, sont en cours de développement mais encore au stade de recherche fondamentale ou s'apparentent plus à des médicaments, étant liés à des principes actifs ou à des protéines spécifiques de certains récepteurs de cellules tumorales.

I.C.6. Dispositifs médicaux implantables actifs

• Organes artificiels

Les progrès technologiques, tels que l'électronique, appliqués à la médecine, rendent réalisable l'idée de remplacer les organes complexes du corps humains comme le cœur par des organes artificiels. Un consortium multidisciplinaire de chercheurs américains a réussi récemment à fabriquer un rein artificiel contenant un filtre composé de milliers de membranes siliconées nanoporeuses permettant de d'arrêter sélectivement les toxines.⁵⁰ Les nanopores seraient suffisamment denses et de forme adéquate pour ne pas altérer le flux sanguin.

Des nouveaux stimulateurs cardiaques ou de nouvelles audioprothèses bénéficient également des avancées en nano-électronique, avec des nanocapteurs sensoriels capables de stocker et de transmettre rapidement des données pour une plus grande réactivité. Les éléments nano-électroniques composants ces dispositifs sont encapsulés et donc sans contact avec l'organisme.

• Prothèses rétiniennes

[†] Technique de création de pores dans les membranes cellulaires par des chocs électriques.

Pour le traitement de la cécité causée par les rétinopathies pigmentaires, des chercheurs développent des implants rétiniens à partir d'éléments nano-électroniques. L'implant est constitué d'une puce d'électrodes attachée à la rétine, en épi-rétinal ou sub-rétinal. Les électrodes conduisent l'information acquise par une caméra externe jusqu'à la rétine pour fournir au patient une forme de vision rudimentaire.

Plusieurs projets sont en cours, en Allemagne, au Japon, aux Etats-Unis, en Australie et en France. Les chercheurs de RETINA IMPLANT (Allemagne) lancent actuellement une deuxième étude clinique sur leur nouvelle prothèse rétinienne améliorée. Le dispositif le plus abouti est l'Argus™ aux Etats-Unis, développé par SECOND SIGHT MEDICAL PRODUCTS (USA), en phase clinique et en cours de marquage CE. Le dispositif médical Argus™ comporte une série d'électrodes de platine sur une plaque en silicium. Les difficultés à résoudre pour la mise au point de ces systèmes prothétiques sont d'empêcher les interférences entre les électrodes et la résolution de l'image restituée. Comme cette dernière dépend grandement du nombre d'électrodes, certains proposent des électrodes 3D pour réduire les interférences.

Concernant la biocompatibilité du système, les parties non-biocompatibles ou électroniques du dispositif sont protégées par une coque protectrice. Cependant, d'autres fabricants cherchent à remplacer cette protection encombrante par un film ultrafin de nanoparticules de diamant (d'environ 5 nm de diamètre), biocompatible et inerte dans des milieux corrosifs.⁵¹ Par exemple, l'Institut de la Vision et le CEA (Commissariat à l'Energie Atomique) ont choisi d'utiliser une couche de diamant dopé nanostructurée pour améliorer la biocompatibilité et les performances des électrodes de stimulation rétinienne.

I.C.7. Dispositifs de diagnostic et de surveillance en continu

Des équipes de recherche et de développement tentent de mettre au point des applications pour la surveillance de l'état physiopathologique du patient ou des outils permettant le suivi du malade.⁵²

Certains fabricants proposent des dispositifs de diagnostic pour le diabète de type I en analysant l'air exhalé du patient. Une équipe américaine du MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) a conçu un dispositif de surveillance de la glycémie *in vivo*, mis en place sous la peau.⁵³ Le dispositif repose sur des nanotubes de carbone qui fluorescent en fonction de la quantité de glucose dans le sang. Les chercheurs doivent maintenant trouver une « encre » dans laquelle mélanger ces nanotubes pour créer une sorte de « tatouage », qui permettrait de surveiller en continu la glycémie.

NANOSPHERE (USA) propose le dispositif Verigene comportant des nanoparticules d'or pour réaliser des tests génétiques et pharmacogénétiques. On peut également imaginer des capteurs incorporés dans les implants, qui seraient capables de suivre en temps réel l'interaction du matériau avec le milieu biologique, en fournissant des données sur la prolifération ou non des cellules sur la

surface de l'implant et quels types de cellule. Le médecin pourrait alors suivre la biocompatibilité des implants *in situ* (au niveau cellulaire).

Les DMDIV (dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*) deviennent plus sophistiqués avec les biopuces génétiques et protéiniques et les *lab-on-chip* (laboratoires sur puces) pour des détections de précision moléculaire.

I.D. Bilan

Cet aperçu nous montre que l'utilisation des nanotechnologies dans le monde des dispositifs médicaux est multiple et ouvre des perspectives intéressantes. Certains dispositifs issus des nanotechnologies sont déjà commercialisés et de nombreux autres sont en développement, dans des domaines tels que l'orthopédie, la chirurgie, la cancérologie, les spécialités cardiovasculaires ou dentaires. Des progrès peuvent aussi survenir dans des applications plus communes comme les produits de soins, les textiles médicaux et les instruments médicaux, pour une amélioration médicale globale. Les futurs nanodispositifs ou nanosondes pourraient bouleverser le monde des dispositifs médicaux actifs et les dispositifs de diagnostic *in vitro*. Ce bref exposé n'a pas l'objectif d'être exhaustif, mais ambitionne de donner une idée du foisonnement et des possibilités qu'offrent les nanotechnologies, en se limitant aux dispositifs médicaux.

D'ailleurs, nous assistons progressivement avec les avancées technologiques à un glissement des frontières entre les médicaments et les dispositifs médicaux. La frontière devient de plus en plus ténue, avec notamment les nanoparticules dans le traitement des cancers ou les dispositifs implantables de suivi de la glycémie. La classification n'est plus forcément évidente et requiert un examen approfondi du mode d'action précis (principal ou accessoire).

Enfin, parmi les perspectives présentées, nombreuses sont celles encore à l'état de recherche précoce, souvent au stade de démonstrations de faisabilité. Des prototypes attendent toujours d'être perfectionnés en laboratoire et dans les essais précliniques, avant de pouvoir être transformés en dispositifs médicaux réalistes et commercialisables. Néanmoins, les nanotechnologies sont véritablement des outils importants pour l'avenir de la médecine, améliorant l'existant mais aussi créant de nouveaux dispositifs plus intelligents, plus perfectionnés et plus biocompatibles. Elles offrent des possibilités qui pourraient pallier les limites actuelles des prises en charge des maladies, pour permettre au final une meilleure qualité de vie au patient, voire un allongement de la durée de vie.

II. Evaluation biologique des nanomatériaux

L'essor des nanotechnologies soulève l'enthousiasme sur de multiples possibilités d'application, mais suscite également des préoccupations sur leurs impacts biologiques potentiels. En effet, les propriétés uniques de nanomatériaux, qui ont permis de proposer des applications exceptionnelles, permettraient à ces nanomatériaux d'atteindre des lieux jusqu'alors inaccessibles dans les organismes vivants, avec une réactivité différente des matériaux conventionnels. C'est précisément leur petite taille, leur grande surface spécifique et leur réactivité accrue qui leur permettent de se lier à des éléments biologiques avec plus d'efficacité et qui font craindre des conséquences notables en termes de toxicité.

Les exemples de toxicité abordés dans ce rapport proviennent des études sur des nanomatériaux utilisés dans divers applications et environnements (médicaments, cosmétologie, pollution, etc.). Ils ne reflètent pas forcément la réalité des dispositifs médicaux, les études sur les effets toxiques des nanomatériaux étant bien plus fournies pour les nanoparticules ou les nanotubes que pour les autres types de nanomatériaux (comme les matériaux nanostructurés). Ils ne sont pas forcément extrapolables non plus.

II.A. Etat des connaissances sur la toxicité des nanomatériaux

Le risque pour l'Homme d'un produit est la combinaison du danger intrinsèque du produit et de l'exposition humaine à ce produit. Selon les études en cours, bien qu'insuffisamment nombreuses et parfois contradictoires, il est généralement admis que la toxicité d'un composé nanométrique serait différente de son homologue conventionnel, différente ne signifiant pas nécessairement supérieure. Par exemple, certains travaux spécifiques publiés indiquent que des nanoparticules de CuO sont effectivement plus génotoxiques que les microparticules. Par contre, d'autres travaux indiquent que dans certains cas, les nanoparticules de TiO₂ sont moins génotoxiques que leurs homologues micrométriques.^{54 54} La toxicité des nanoparticules de TiO₂ sera détaillée dans la partie II.B.3.

Afin de mieux cerner les risques de toxicité, nous allons présenter un état des lieux sur les effets biologiques potentiels des nanomatériaux. Cependant, ce rapport n'a pas pour objectif de collecter et d'évaluer de manière exhaustive toutes les études de toxicologie des nanomatériaux menées jusqu'à présent. Il fera uniquement référence aux points clés des connaissances à ce jour sur la question. Pour plus de détails, le lecteur est invité à consulter des rapports et revues scientifiques faits sur le sujet.^{3, 55}

II.A.1. Interactions entre nanomatériaux et systèmes biologiques

Tout d'abord, lorsqu'un nanomatériau se trouve exposé à un milieu biologique, son comportement résulte de différents facteurs et ne dépend pas uniquement de ses caractéristiques intrinsèques. En effet, les nano-objets au contact d'un environnement biologique sont immédiatement recouverts d'une « couronne » dynamique de protéines (« corona »), de composition variable.⁵⁶ La majorité des études portant sur l'adsorption de protéines à la surface des nanoparticules a utilisé le plasma ou le sérum (composé d'environ 3700 protéines),⁵⁷ comme modèles de fluide biologique. Elles se sont intéressées aux effets de l'adsorption des protéines plasmatiques sur la reconnaissance cellulaire, notamment par les macrophages. Des études portent également sur les interactions avec le mucus et le surfactant pulmonaire. La biodistribution des nano-objets et les réponses cellulaires qui en découlent dépendent de l'interaction entre les protéines d'un milieu biologique et les nano-objets.

Toutefois, ces deux modèles de fluide biologique *in vitro* reflètent mal les situations *in vivo*. En effet, la chélation des ions divalents (comme le calcium) en général par des ions citrate additionnés au plasma afin de bloquer le développement de la cascade de la coagulation, bloque également l'activation amplifiée du système du complément (défense immunitaire non spécifique). L'addition de doses contrôlées d'ions calcium permet d'évaluer les phénomènes amplifiés de la coagulation lors du contact avec une surface de matériau. De même, dans le sérum, l'absence essentielle du fibrinogène supprime tout effet lié à cette protéine, alors que l'addition de doses contrôlées d'ions calcium et magnésium permet d'évaluer l'activation amplifiée du complément. Il en résulte que l'activation rapide et simultanée *in vivo* de ces deux systèmes amplifiés, lors du contact avec une surface de matériau, ne peut pas être observée *in vitro*.

• **Cinétique de liaison des protéines sur des nano-objets**

La composition de la couronne de protéines adsorbées sur des nano-objets à un temps donné dépend des concentrations et de la cinétique d'adsorption des protéines présentes dans les fluides biologiques. Il est important de déterminer quelles protéines sont adsorbées sur la surface des nanomatériaux, mais également de comprendre les affinités de liaison et les stoechiométries mises en jeu. Ainsi, l'affinité d'une protéine pour la surface d'un nano-objet diffère de son affinité pour ce même matériau massif (effet de la taille, de l'aire disponible et de la courbure de la nanoparticule).⁵⁸ De plus, le complexe nano-objet/protéines adsorbées est susceptible d'évoluer au cours du temps : les protéines présentes en fortes concentrations vont ainsi s'adsorber très rapidement et occuper la surface des nano-objets, mais par la suite ces protéines peuvent se dissocier du matériau et être remplacées par des protéines présentes en plus faibles concentrations mais de plus fortes affinités (effet Vroman).

A titre d'exemple, l'albumine s'adsorbe ainsi très rapidement sur différents types de nano-objets (lipides, polystyrène, PEG-PHDCA...), puis la quantité d'albumine adsorbée se stabilise voire diminue pour être remplacée par d'autres protéines comme le fibrinogène, les apolipoprotéines, les protéines C3 du système du complément, les IgG, etc.^{58b, 59}

• **L'adsorption des protéines dépend des propriétés des nanomatériaux**

Des propriétés intrinsèques aux nano-objets influencent l'adsorption des protéines plasmatiques. Il a été observé qu'elle tend à augmenter avec le potentiel zêta du nano-objet, qui reflète sa charge de surface,^{58b, 60} sans variation du profil des protéines adsorbées.

L'hydrophobie de la surface d'un nano-objet influence non seulement la quantité de protéines adsorbées, mais également le type de protéines. De façon générale, les nano-objets hydrophobes, adsorbant plus de protéines plasmatiques que les nano-objets hydrophiles, sont opsonisés plus rapidement (capturés par le système immunitaire pour être phagocytés).^{58b, 61}

Pour certains auteurs, les propriétés de surface (charge et hydrophobie) sont d'ailleurs probablement plus importantes pour l'adsorption des protéines que la composition même du nanomatériau (type de matériau, forme, taille). Toutefois, cette dernière ne peut pas être négligée, car de nombreux composés, chimiquement différents, diffusent en surface des nanomatériaux modifiant ainsi la physico-chimie de leur surface. On peut également noter que la structure des protéines, leur stabilité, leur activité ou fonctionnalité peuvent être modifiées suite à leur adsorption sur un nanomatériau.^{58a, 62}

La présence de nanostructures sur des surfaces détermine également l'adsorption des protéines sur ces matériaux.⁶³ Par exemple, la concentration et la conformation de fibronectine adsorbée sur des surfaces de tantale nanostructurées, diffèrent en fonction de la topographie des nanostructures.⁶⁴ En particulier, les séquences RGD contenues dans la fibronectine et nécessaires pour la reconnaissance cellulaire, ne présentent pas la même accessibilité aux cellules selon les surfaces nanostructurées. L'organisation des nanostructures sur les matériaux est également décisive pour l'adsorption des protéines et les réactions cellulaires. Les densités de greffage et les longueurs de «nanobrosses» de polymères (PDMA, PNIPAM) influent l'adsorption des protéines : plus les surfaces présentent de fortes densités de greffage des brosses et plus celles-ci sont longues, moins les protéines plasmatiques s'adsorbent.⁶⁵ Ces effets des nanobrosses ont été prévus dans un modèle théorique de brosses de poly(oxyéthylène) (PEO) greffées sur une surface et démontrés expérimentalement au moyen de nanoparticules à cœur poly(lactide-glycolide) (PLGA) et couronne PEO.^{66, 67, 68}

Les propriétés de surface des nanomatériaux sont ainsi capitales pour l'adsorption des protéines.⁶⁹

- ***L'adsorption des protéines influence la biodistribution des nano-objets et la réponse cellulaire***

L'adsorption des protéines sur les nano-objets, influencée par les propriétés de ces derniers, peut modifier leur taille et leur charge de surface. Ces facteurs sont donc susceptibles d'avoir des conséquences sur l'internalisation des nano-objets dans les cellules, la réponse cellulaire, ainsi que leur distribution dans l'organisme.⁷⁰

Le phénomène d'adsorption compétitive des protéines sur un nanomatériau joue un rôle important dans l'activation amplifiée du complément. En effet, les nanomatériaux, des corps étrangers activant potentiellement ce système, sont captés en quelques minutes par les macrophages situés dans les organes du Système des Phagocytes Mononucléés (SPM) tels que le foie et la rate.

Ainsi l'adsorption d'opsonines comme les IgG, les protéines du complément et le fibrinogène favorise la phagocytose et l'élimination des nano-objets de la circulation. Ces éléments sont ensuite séquestrés dans les organes du système réticulo-endothélial et concentrés dans le foie et la rate.^{58b, 71} Inversement, l'albumine adsorbée à la surface des nanoparticules semble prolonger leur présence dans le sang^{58b} et peut diminuer la réponse inflammatoire.⁷² Toutefois, la présence d'albumine adsorbée à la surface de nanoparticules de PLA ne prolonge pas toujours leur présence dans le sang.⁷³

Concernant la nanostructure de surface, il a été montré que la densité de greffage de brosses, en influençant la nature des protéines adsorbées, peut avoir des conséquences variables sur la coagulation sanguine et l'activation plaquettaire : les surfaces greffées à forte densité par des brosses de PDMA n'activent pas les plaquettes, alors que ces surfaces greffées par les mêmes brosses mais à plus faible densité induisent la coagulation et l'activation plaquettaire.^{65a}

D'autres effets de nanostructures de surface ont été démontrés sur des nanoparticules à cœur poly(cyanoacrylate d'alkyle) (PACA) et couronne constituées de polysaccharides (dextrane, chitosane...) soit en brosses, soit en boucles. Alors que l'augmentation de la longueur des brosses diminuait l'activation du complément de sérum humain en présence des nanoparticules, l'augmentation de la longueur des boucles augmentait cette activation.⁷⁴ Dans ce cas, l'adsorption des protéines plasmatiques était sans relation avec l'activation du complément.

De même pour les matériaux de surface nanostructurée, la quantité et le type de protéines adsorbées sont essentiels pour l'adhésion des cellules, leur migration et leur différenciation.^{18b} Par exemple, Yang *et al.* ont remarqué que des surfaces de titane de rugosité nanométrique adsorbaient mieux et en plus grande quantité la fibronectine que l'albumine. L'adhésion des ostéoblastes est plus favorisée sur des surfaces de titane recouvertes de fibronectine plutôt que d'albumine.⁷⁵

II.A.2. Toxicocinétique et biodistribution

Les connaissances « macro/micro » ne sont pas forcément transposables à l'échelle « nano », notamment pour le devenir des nanomatériaux dans l'organisme. Les phénomènes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME) semblent différer par rapport aux substances chimiques classiques. Par conséquent, les études de toxico-cinétique sont indispensables pour évaluer les risques toxicologiques qui peuvent survenir lors de l'utilisation du dispositif médical contenant des nanomatériaux. Quatre facteurs influencent notamment cette étude toxico-cinétique : la voie d'administration, la taille de l'objet, l'état de la surface (charge, chimie) et l'espèce animale.

Dans le cadre de l'utilisation d'un dispositif médical, les nanomatériaux peuvent pénétrer dans l'appareil respiratoire pour des DM d'abord respiratoire ou ORL, dans l'appareil digestif pour des DM

d'abord digestif, à travers la peau pour les DM d'abord cutané ou percutané, pour se retrouver finalement dans le sang. Ils peuvent également s'y trouver directement pour les DM invasifs de type chirurgical qui incluent notamment les implants. Ensuite, véhiculés par le sang, ils peuvent se retrouver dans le foie et dans des organes « cibles » pouvant stocker les nano-objets. Ils peuvent être identifiés dans les urines, soit par l'utilisation d'un DM d'abord génito-urinaire, soit par élimination. Enfin, ils peuvent être éliminés dans les fèces selon leurs caractéristiques physico-chimiques (cf. Figure 1).

Comme nous voyons sur le schéma ci-dessous (Figure 1), certaines voies de transport ont été démontrées dans des publications, mais d'autres restent à l'état d'hypothèse. La quantification des transferts de nanomatériaux, leur accumulation et rétention dans les organes et tissus cibles demeurent en grande partie des inconnues.^{55c}

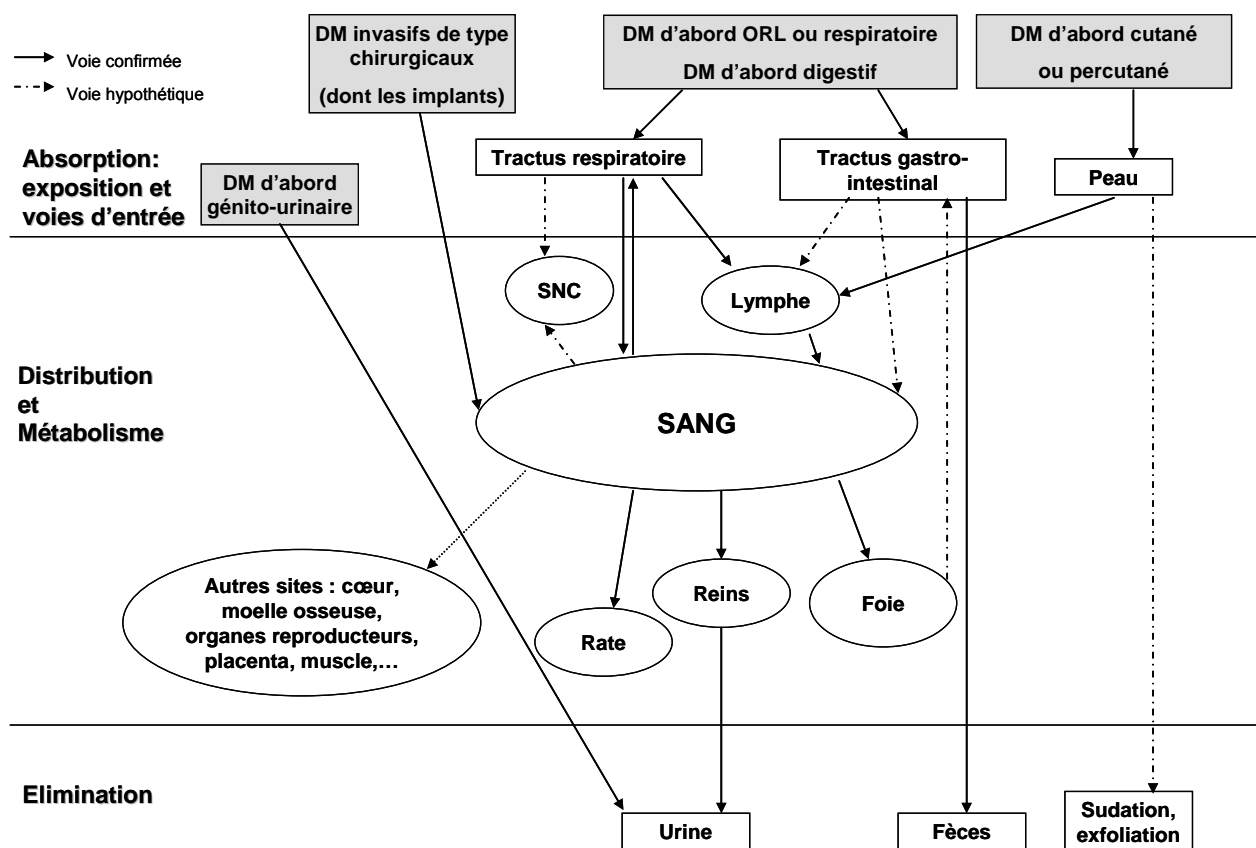


Figure 1. Bio-cinétique et distribution possible des nanomatériaux incorporés dans des dispositifs médicaux.

Les flèches pleines représentent les voies confirmées par des études, les flèches pointillées les voies hypothétiques. DM : dispositif médical, SNC : Système Nerveux Central - Figure adaptée à partir d'Oberdörster *et al.*¹

• Absorption par la peau

La peau saine est généralement une barrière physique efficace contre les agressions environnementales. Elle est structurée en trois couches principales : l'épiderme, le derme et la couche sous-cutanée. La majorité des produits chimiques est arrêtée par la couche externe de l'épiderme, la couche cornée.

C'est effectivement le cas pour les nanoparticules de TiO₂ d'après de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, qui montrent une pénétration limitée à la couche cornée d'une peau saine.^{55c, 55i, 76} Notamment, une étude *in vivo* récente a montré que la pénétration des nanoparticules de TiO₂ est non significative sur la peau saine de porcs.⁷⁷ Ces nanoparticules utilisées dans les produits commerciaux sont généralement de la forme rutilé, moins réactives que la forme anatase.^{55c} Elles sont souvent enrobées d'une couche de silice ou d'alumine, qui est fonctionnalisée pour plus de stabilité. Or ces nanoparticules primaires de 10-30 nm ont tendance à s'agglomérer entre elles pour former des agrégats de plusieurs microns.

Pour prendre un autre exemple, les nanoparticules d'argent, des études *in vitro* sur peaux humaines ont montré une faible absorption à travers la peau intacte alors que dans le cas d'une peau lésée, la pénétration systémique des nanoparticules d'argent est possible,⁷⁸ voire importante, la barrière étant endommagée.

D'autres études montrent que la pénétration des particules nanométriques peut être plus profonde pour celles de très petite taille (< 10 nm),⁷⁹ le risque d'absorption étant là-aussi d'autant plus important pour des peaux abîmées (ex. : brûlées, lésées ou psoriasiques).

De plus, il a été montré que la flexion mécanique de la peau peut également faciliter grandement la pénétration des nanoparticules de fullerène^{79a} et des microparticules de béryllium.⁸⁰ Par contre, si des nanoparticules ont pu être détectées dans les follicules pileux, leur passage à travers la peau n'a pas été décelé.⁸¹

La durée d'exposition semble jouer aussi sur l'absorption cutanée. En effet, Wu *et al.* ont récemment montré que la pénétration des nanoparticules de TiO₂ (4 et 60 nm) n'allait pas au-delà des couches profondes de l'épiderme des porcs, suite à une exposition cutanée jusqu'à 30 jours. Cependant, une exposition plus importante chez des souris nues pouvait induire une toxicité chronique importante, avec génération des radicaux libres et appauvrissement en collagène.^{79c} Après 60 jours, les nanoparticules avaient franchi la barrière dermique, atteint différents tissus et provoqué des lésions pathologiques dans des organes majeurs, comme le foie.

● **Absorption par le poumon**

Le dépôt des nano-objets dans le tractus respiratoire dépend de nombreux facteurs dont la taille, la force d'inhalation et la structure des voies aériennes. La toxico-cinétique de cette voie d'entrée a été largement étudiée dans le cadre de la sécurité sanitaire environnementale (pollution atmosphérique) et des travailleurs. En se basant sur des modèles mathématiques et ceux de la Commission Internationale sur la Protection Radiologique, près de 90% des nanoparticules de moins de 100 nm inhalées seraient déposées dans le tractus respiratoire, dont une partie est arrêtée dans les voies respiratoires supérieures et environ 50% diffusent dans la région alvéolaire, alors que la proportion de particules de 100 nm à 1µm pénétrant dans les voies respiratoires supérieures est moindre.⁸² Les nanoparticules de moins de 10 nm s'arrêteraient au niveau des voies respiratoires supérieures.

Les nano-objets présents dans les voies respiratoires sont principalement pris en charge par la clairance muco-ciliaire pour être expectorés ou transférés vers le tractus gastro-intestinal afin d'être éliminés dans les fèces.^{55f} D'autres, solubles, se dissoudraient dans le mucus qui baigne l'épithélium et passeraient dans la circulation sanguine et lymphatique, puis seraient distribués dans d'autres organes comme les reins pour élimination. Au niveau alvéolaire, la clairance se fait par les macrophages alvéolaires résidents. S'ils ne sont pas épurés, les nanomatériaux insolubles vont s'accumuler et surcharger les mécanismes de défense pulmonaire, voire migrer très partiellement à travers la barrière pulmonaire. Leur bio-persistance peut avoir des conséquences néfastes d'inflammation, de toxicité chronique et des risques cancérogènes comme ce qui a été remarqué avec les fibres d'amiante. Or il a été montré que les nanotubes de carbone, de structure fibrillaire semblable, ne sont que très lentement éliminés des poumons des rongeurs étudiés : 81% sont encore décelés 60 jours après l'exposition.⁸³ Les études récentes sur diverses nanoparticules radiomarquées et des nanotubes de carbone après inhalation chez le rat montrent qu'environ 1% des nano-objets inhalés pourraient migrer au niveau systémique et s'accumuler dans divers organes dont le foie et la rate.^{84, 85, 86}

• **Absorption orale**

L'origine des nanomatériaux dans le tractus gastro-intestinal peut venir des dispositifs médicaux d'abord digestif, mais aussi de la migration des nano-objets inhalés ou encore des produits dentaires. Plusieurs études ont montré que les micro- et nanoparticules sont absorbées dans le tractus digestif principalement à travers les plaques de Peyer du petit intestin et à travers les entérocytes intestinaux.⁸⁷ Il semblerait que la taille et la charge des nanomatériaux influencent le taux d'absorption. Dans le cas des nanoparticules d'or, plus elles sont petites, meilleure est leur absorption gastro-intestinale et elles sont distribuées dans un plus grand nombre d'organes.⁸⁸ De même, les nanoparticules de polystyrène chargées positivement seraient plus efficacement absorbées que celles qui sont neutres, tandis que celles qui sont chargées négativement diffuseraient à travers la couche de mucus et viendraient interagir avec les cellules épithéliales.⁸⁹

Il semblerait que les nanoparticules ingérées soient rapidement éliminées : 98% dans les fèces en 48h et le reste dans l'urine.^{55j} Certaines études indiqueraient aussi une migration partielle dans la circulation sanguine, les ganglions lymphatiques et une distribution systémique dans des organes comme le foie et les reins. En effet, les débris provenant des prothèses dentaires ou des composites⁹⁰ absorbés par voie orale peuvent s'accumuler dans ces organes, conduisant à des effets sur la santé, comme de la fièvre, un enflure de la rate et du foie, la suppression de la circulation biliaire et une défaillance rénale aiguë. Ces symptômes ont été observés au bout d'un an après la pose des bridges dentaires en céramique et ont disparu lorsque les prothèses ont été enlevées.⁹¹

• **Distribution systémique et métabolisme**

Se trouvant directement dans la circulation sanguine ou indirectement, les nanomatériaux peuvent être opsonisés, reconnus par le système réticulo-endothélial et phagocytés par les macrophages en vue de leur élimination de la circulation. Ils sont ensuite distribués dans différents

organes, comme la rate, le foie et le rein.⁹² On peut en détecter aussi dans le cœur, les poumons ou la moelle osseuse. La migration dans le Système Nerveux Central (SNC) est également envisageable. Des enzymes, comme des protéases ou des métallothionéines, dans les organes pourraient intervenir dans le métabolisme des nano-objets métalliques.⁸⁷

La fonctionnalisation des surfaces des nanomatériaux prend ici une importance particulière, car elle influence la bio-distribution et la cinétique. Par exemple, une enveloppe de polymère de PEG (polyéthylène glycol) empêcherait en partie leur capture par le foie et la rate⁹³ et prolongerait leur présence dans la circulation.^{61, 94} De même que l'état de surface, la taille et la forme déterminent le devenir des nanomatériaux dans l'organisme. Notamment, certains chercheurs ont montré que la biodistribution la plus large est observée pour les plus petites nanoparticules d'or (10 nm).⁹² D'autres ont trouvé que la biodistribution est similaire, mais que la biopersistance et le taux de transfert diffèrent selon la taille des nanoparticules de polystyrène.⁹⁵

• **Elimination**

L'élimination des nanomatériaux est encore très mal connue et dépend essentiellement de la voie d'exposition et des paramètres physico-chimiques du matériau étudié (taille, état de surface...). Les nanomatériaux ingérés ou inhalés sont principalement éliminés dans les matières fécales, comme toutes les substances étrangères entrées par ces voies.

Pour les nanomatériaux présents dans la circulation systémique, on cite souvent la voie classique d'élimination rénale, comme c'est le cas pour les fullerènes et les nanotubes de carbone.⁹⁶ Une autre voie a été suggérée pour les nanoparticules de polystyrène, le foie avec excrétion dans la bile.⁹⁷ C'est une voie d'excrétion connue en pharmacologie, mais qui reste à être confirmée pour les nano-objets.

L'élimination des *quantum dots* est en revanche très difficile à déterminer, malgré une biodistribution bien caractérisée grâce à leur fluorescence. En effet, les études d'élimination sont contradictoires, les résultats dépendant largement des enrobages et de la taille des nanoparticules.⁹⁸ Néanmoins, une étude décrit que 133 jours après leur injection intraveineuse, il est toujours possible d'en détecter dans les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse des souris.⁸⁷

La biopersistance des nanomatériaux fait craindre, pour certains d'entre eux, un risque de toxicité chronique, voire de développement de cancers. Cependant, pour le moment, rares sont les données sur les conséquences de l'accumulation des nanomatériaux dans l'organisme.

II.A.3.Cytotoxicité

Lorsque les cellules sont exposées à des éléments qu'elles peuvent phagocyter et qu'elles n'éliminent pas, elles initient une réponse qui peut se caractériser par la sécrétion de facteurs de l'inflammation tels que des cytokines pro-inflammatoires. Ceci entraîne une réaction inflammatoire mettant en jeu le système immunitaire qui peut faire intervenir les lymphocytes B ou les macrophages dans le cadre d'une réponse d'hypersensibilité retardée. Ces réponses sont associées à des

modifications dans l'expression de différents gènes dont les gènes de l'inflammation, de l'apoptose ou de contrôle du cycle cellulaire. Elles peuvent également être responsables de lésions de l'ADN faisant craindre des risques de génotoxicité et de cancérogénicité.

De nombreuses études de cytotoxicité ont été conduites pour évaluer le potentiel toxique de nanomatériaux, mais aucun consensus ne s'est encore dégagé actuellement, en raison des variabilités des méthodes expérimentales, des lignées cellulaires choisies et tout simplement des nanomatériaux étudiés.⁹⁹ En effet, les effets cytotoxiques diffèrent selon la taille, la forme, la composition chimique et l'état de surface du nanomatériau. De plus, il est conseillé d'être vigilant sur l'interprétation des résultats des tests de cytotoxicité en fonction du temps d'exposition, une exposition longue pouvant naturellement entraîner un effet plus cytotoxique. Toutefois, la cytotoxicité des nanomatériaux est conditionnée par deux choses : la capacité d'être internalisés par les cellules et la capacité d'induire une cytotoxicité (par stress oxydatif, apoptose...).

Tout comme les nano-organismes (tels que les virus), les nano-objets sont capables de pénétrer à l'intérieur de cellules et d'interagir avec les espèces biologiques intracellulaires.^{55j} La voie classique d'internalisation est l'endocytose, en particulier pour les agglomérats de nanoparticules qui se retrouvent alors dans des vésicules cytoplasmiques.¹⁰⁰ Certains auteurs ont aussi proposé que les nanoparticules, de quelques nanomètres, puissent pénétrer dans les cellules à travers des canaux ioniques ou des pores membranaires et d'autres, que le passage de nanoparticules puisse aussi s'effectuer passivement, par diffusion et interaction entre la surface des nanomatériaux avec la membrane cellulaire, sans formation de vésicules.¹⁰¹ Les interactions peuvent être de type Van der Waals, électrostatique, stérique ou tensions superficielles. Ce type d'internalisation présente un risque car les nanomatériaux peuvent se déplacer librement à l'intérieur de la cellule, rencontrant directement les protéines cytoplasmiques et les organelles. L'internalisation cellulaire par diffusion est observée pour les petites nanoparticules, notamment si elles sont lipophiles (ex : 25-50 nm¹⁰²).

La localisation des nano-objets dans la cellule dépend souvent de leur taille. Les microparticules se retrouvent dans de larges vacuoles cytoplasmiques, tandis que les nano-objets, plus petits, se situent plutôt dans de petites vésicules ou sont libres dans le cytoplasme.^{55f} Cependant ces derniers ont tendance à s'agglomérer dans les cellules et sont finalement regroupés dans des vacuoles cytoplasmiques, eux aussi. La présence de nanoparticules dans les mitochondries a également été décrite, même si elle est rare.¹⁰³ A l'intérieur des cellules, les nanomatériaux peuvent interagir avec les composants biologiques et perturber les fonctions cellulaires. Le niveau de dose peut également influencer la distribution intracellulaire des nanoparticules. En effet, Yang et al. (2010) ont montré que si les lysosomes sont les organites cibles, les nanotubes de carbone monofeuillets (SWCNTs) sont également internalisés dans les mitochondries à fortes doses (80% lysosomes/20 % mitochondries à partir de 400 mg/kg per os chez la souris mâle).¹⁰⁴

Les nanotubes de carbone, *quantum dots*, les fullerènes ou les nanoparticules d'or ou de TiO₂ seraient capables d'induire l'apoptose.^{98, 105} D'autres nanomatériaux peuvent interagir avec le noyau, provoquer des lésions de l'ADN ou des mutations.

Néanmoins, concernant les mécanismes de cytotoxicité, le principal mécanisme des nanomatériaux concerne leur capacité à induire le stress oxydatif par la formation des radicaux libres comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS), menant à l'activation des voies de signalisation sensibles aux potentiels redox.^{55j} Le processus déclenché culminerait dans la production de cytokines et chemokines impliquées dans des réponses pro-inflammatoires. A force d'accumulation, les organes du système réticulo-endothélial seraient endommagés à terme.

Les sources de radicaux libres sont multiples. La surface des nanomatériaux, pouvant être très réactive, est le théâtre de nombreuses réactions chimiques qui se produisent entre le nanomatériau et les espèces environnantes. Certains matériaux sont composés de métaux de transition, qui, ionisés, sont des catalyseurs de réactions, produisant des radicaux libres ou des ROS (réactions type Fenton ou Haber-Weiss). Les radicaux libres proviendraient également de la réponse phagocytaire classique des cellules face à un corps étranger. On retrouve aussi une augmentation des lésions oxydatives résultant de la perturbation de l'activité mitochondriale (chaîne de transport des électrons).¹⁰⁶

Les nanomatériaux semblent générer plus de radicaux libres et de ROS que leurs homologues de plus grande taille, probablement à cause de leur surface spécifique plus grande.¹⁰⁷ Même si pour certains nanomatériaux non solubles, le rôle de la taille a été démontré dans les mécanismes de cytotoxicité, il est encore trop tôt pour déterminer si la cytotoxicité observée des nanomatériaux est aussi due à une toxicité, basée sur la composition chimique (comme la libération d'ions qui sont les métabolites actifs ou des réactions catalysées avec les éléments de surface). Il existe encore trop peu de données comparables et fiables et les méthodes analytiques et expérimentales ne sont pas suffisantes pour conclure. En effet, des chercheurs ont montré que quelques nanomatériaux interfèrent avec la lecture de certains tests de cytotoxicité.^{99, 108}

II.A.4. Immunotoxicologie, hypersensibilité retardée et irritation

Lorsqu'un organisme est agressé, il existe deux types de mécanisme de défense : spécifique ou non-spécifique. La réponse non-spécifique est immédiate et apparaît rapidement après l'agression. C'est par exemple le cas des réactions d'irritation qui surviennent dès le premier contact. En revanche, la réaction spécifique ne se manifeste qu'après plusieurs expositions. L'hypersensibilité retardée est notamment une réaction allergique spécifique qui requiert une sensibilisation au préalable du malade à l'agent allergène. La réponse nécessite plusieurs contacts avec l'agent allergène et fait intervenir le système immunitaire.

Le système immunitaire est par définition le gardien de l'organisme contre les agressions qui viendraient perturber son bon fonctionnement. Ce système est à la fois très complexe et très finement régulé : il fait intervenir de nombreux composants tant humoraux (cytokines, chimiokines, complément, anticorps etc.) que cellulaires (cellules dendritiques, lymphocytes T et B, etc.), et toute perturbation pourra aussi bien entraîner une stimulation qu'une répression en fonction des éléments impliqués.

Les recherches en immunotoxicité des nanomatériaux sont plutôt centrées sur les nanoparticules et les principaux résultats vont être détaillés ci-dessous. Les nanoparticules manufacturés peuvent être classées en deux grandes familles, celles qui sont fabriquées pour être « furtives » et donc pour passer inaperçues du système immunitaire et celles qui doivent cibler des éléments cellulaires qui risquent d'entraîner une interférence avec ce système.

- **« Furtivité » des nano-objets**

Nous pouvons parler de furtivité lorsque les nanoparticules sont confondues avec les éléments du « Soi » ou de façon plus générale lorsqu'elles ne sont pas identifiées par les mécanismes de défense ; cette absence de reconnaissance est sans conteste un enjeu majeur dans l'élaboration des nanoparticules. Les caractéristiques physiques de ces nano-objets (taille, forme, charge de surface, caractère hydrophile / hydrophobe) vont conditionner la compatibilité avec le système immunitaire. Des polymères tels que le poly-éthylène-glycol (PEG) ont souvent été utilisés pour recouvrir les nanoparticules afin de leur conférer un caractère hydrophile, qui les rend invisibles au système immunitaire.¹⁰⁹ La furtivité est conférée par l'effet de répulsion stérique par une couronne de polymère hydrophile, comme expliqué ci-dessus. C'est le cas pour le PEG (ou PEO) en brosse ou en boucles¹¹⁰ ainsi que pour des polysaccharides en brosses longues uniquement.¹¹¹ Cependant, ces constructions ont parfois conduit à la production d'anticorps anti-PEG,¹¹² ce qui a pour effet une élimination plus rapide des complexes PEG-nanoparticules de l'organisme¹¹³ et un risque de réponse inflammatoire ou anaphylactique.

Par ailleurs, de nombreuses protéines sériques peuvent se fixer sur les nanoparticules et entraîner une modification de leur traitement par les cellules immunitaire (interaction avec des récepteurs spécifiques), ce qui peut induire un détournement complet des nanoparticules de leur objectif initial.

- **Nanoparticules et réponse immunitaire**

L'impact d'une nanoparticule sur le système immunitaire peut se faire à de nombreux niveaux. Il peut se traduire par des inflammations, perturber des réactions allergiques, voire des réactions auto-immunes.¹¹⁴ Cela dépendra du caractère antigénique propre du nano-objet, de son pouvoir adjuvant ou inflammatoire ou de sa capacité à activer le système du complément. Suivant les cas, la résultante de ces interactions sera une amplification ou une inhibition de la réponse immunitaire, les nanoparticules seront alors considérées comme immunostimulantes ou immunosuppressives.

- **Nanoparticules et antigénicité**

L'établissement d'une réponse immune spécifique se traduit par la production d'anticorps et/ou de cellules qui vont reconnaître l'élément étranger. Or, jusqu'à maintenant très peu de travaux ont montré que les particules pouvaient induire une réponse immunitaire qui leur soit spécifique. Des anticorps anti-C₇₀ ou C₆₀ fullerène ont été décrits mais ces résultats n'ont pas pu être reproduits même en présence d'adjuvants forts.¹¹⁵

- **Effet adjuvant**

Un adjuvant est un élément capable de stimuler la réponse immunitaire induite par un antigène donné. De nombreuses publications démontrent la capacité adjuvante des nano-objets¹¹⁶ : par exemple, de petites molécules attachées à des nanoparticules d'or induisent une réponse (synthèse d'anticorps spécifiques) plus forte qu'en présence d'adjuvant classique et ce avec moins d'antigène.¹¹⁷ L'origine de ce phénomène n'est pas clairement définie et peut sans doute être fonction de la nanoparticule et de l'antigène considéré. La nature et l'amplitude de la réponse immunitaire varie en fonction de plusieurs paramètres : temps de présence dans l'organisme de l'antigène, endocytose par les cellules immunitaires, activation de ces mêmes cellules. Or les nano-objets peuvent avoir une action sur chacune de ces variables : ils peuvent avoir un temps de rétention dans les tissus bien plus long que les protéines, ils peuvent être internalisées par les cellules immunitaires en forte quantité et rester dans ces cellules, ils peuvent également induire une réponse inflammatoire qui entraîne une activation des cellules, ce qui favorise l'induction de la réponse immunitaire. Cependant, la contrepartie de cet effet amplificateur est que les nano-objets peuvent induire des dérèglements importants comme des réactions allergiques : il a été montré que les nanotubes de carbone augmentent l'allergie à l'ovalbumine via l'induction de réponses inflammatoires aiguës.¹¹⁸

● **Effet inflammatoire**

La mise en place d'une réponse immunitaire et notamment son orientation vers les voies Th1, Th2, Th17 ou Treg fait intervenir de nombreux paramètres dont les cytokines qui ont un rôle primordial. Or la sécrétion de ces molécules est en partie contrôlée par l'état inflammatoire des cellules : plusieurs travaux ont montré que différents paramètres physiques des nano-objets pouvaient intervenir :

la charge (des liposomes cationiques induisent l'activation de cellules, mais pas les liposomes anioniques)¹¹⁹

la taille (des particules de polystyrène inférieures à 100 nm ont un effet beaucoup plus stimulant sur la production d'anticorps que celles dont la taille est supérieure à 500 nm). Des réponses Th1 ou Th2 semblent avoir été induites respectivement par des nanoparticules de PLGA de 80 nm et plus ou par des dendrimères (macromolécules constituées de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel) de 5 nm.¹²⁰ Cependant dans ces différents cas, le fait que les auteurs aient utilisé des réactifs différents peut également avoir un effet sur la réponse induite puisque même les contaminants des préparations des nanoparticules peuvent avoir une influence sur les réponses obtenues. La modification chimique de la surface des particules leur permet d'interagir avec des récepteurs membranaires (TLRs, récepteurs du complément, récepteur MARCO, etc.) comme le feraient des pathogènes et entraîne un ciblage des particules vers les cellules impliquées dans la réponse immunitaire comme les cellules dendritiques.¹²⁰ La réaction inflammatoire peut également provenir du stress oxydatif induit par les nanoparticules formées d'oxydes métalliques ;¹²¹ suivant leur potentiel oxydant, ces matériaux ont des impacts potentiellement importants depuis l'inflammation jusqu'à la cytotoxicité ou la génotoxicité.¹²²

● **Internalisation par les cellules immunitaires**

Les cellules impliquées dans l'induction des réponses immunitaires (cellules dendritiques et à un moindre degré les macrophages) ont une très forte capacité d'internalisation. Non seulement ces cellules expriment à leur surface plusieurs récepteurs internalisables après fixation de leur ligand, mais en plus, elles sont capables de phagocytose, c'est-à-dire qu'elles peuvent internaliser des ligands dont la taille peut atteindre plus de 500 nm. Si la présence des nanoparticules à l'intérieur des cellules est largement documentée par de nombreuses publications, le processus d'internalisation n'est pas clairement établi dans la majeure partie des cas et change sans doute en fonction des particules. La fixation de protéines sériques sur les nanoparticules peut servir à l'internalisation comme cela a été montré pour la fétuine⁷¹, de nombreux récepteurs cellulaires ont été impliqués : récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines (fullerènes)¹²³, récepteurs du complément (nano-capsules lipidiques de 10 à 100 nm)¹²⁴, récepteurs au mannose pour des particules de chitosan.¹²⁵ D'une part, l'internalisation augmente avec le potentiel zêta ; d'autre part, la forte taille de certaines particules ou agglomérats favorise la phagocytose.¹²⁶ Or l'internalisation des nano-objets par les cellules immunitaires pourraient potentiellement perturber le bon fonctionnement de ces cellules et donc du système immunitaire.

● **Immunosuppression**

Bien que la majeure partie des études réalisées avec les nanoparticules insistent sur les aspects inflammatoires, il existe quelques exemples qui montrent que des nano-objets pourraient également induire une immunosuppression : les nanotubes de carbone pourraient catalyser la synthèse de TGF- β par les macrophages avec pour conséquence un blocage des lymphocytes B.¹²⁷ Des nano-objets sont parfois utilisés pour vectoriser des immunosuppresseurs stéroïdiens (traitement de l'arthrite) ou pour le traitement d'auto-immunité (transport de collagène pour le traitement d'arthrite rhumatoïde),¹¹⁵ mais ils peuvent également avoir une activité immunotolérante : des peptides sous forme de dendrimères peuvent bloquer une encéphalomyélite allergique.¹²⁸

● **Nanomatériaux et hypersensibilité**

La capacité des nanomatériaux à induire une réaction d'hypersensibilité après un contact dépend d'abord de son aptitude à traverser la barrière, comme la peau, et à interagir avec des protéines. C'est généralement le complexe nano-objet / protéine qui est reconnu par le système immunitaire et qui est donc essentiel pour la sensibilisation. Nous avons déjà évoqué des expériences qui montrent que les nano-objets peuvent servir de vecteur aussi bien pour induire que pour réduire des réactions allergiques dirigées contre des protéines. Par contre, il n'y a pas de preuve claire en faveur d'hypersensibilité résultant de la seule présence des nano-objets et qui soit dirigée contre ceux-ci. Cependant, les nanoparticules de nickel font exception car il semble que, dans ce cas, les ions nickel issus de la solubilisation de la particule sont à l'origine de la réaction inflammatoire¹²⁹ en réagissant avec des récepteurs (TLR4).¹³⁰ De façon plus générale, certains auteurs pensent même que la toxicité observée en présence de nanoparticules pourrait être due à leur solubilisation dans les milieux biologiques ou dans les cellules, les ions résultant étant en fait plus toxiques que les nanoparticules dont ils sont issus.¹³¹

• **Potentiel irritant**

L'application topique des nanomatériaux sur la peau a en général conduit *in vivo* à des réactions d'irritation faibles à modérées.^{76b} Les études sur les nanoparticules d'oxydes métalliques, utilisées dans les produits cosmétiques et les crèmes solaires, ont montré un faible potentiel irritant.⁵⁵ⁱ De même, certaines études sur des nanotubes de carbone semblent indiquer qu'ils ne provoqueraient pas d'irritation dermique¹³² ou oculaire.¹³³ D'ailleurs cette absence de réaction d'irritation contraste avec les réactions de dermatites de contact bien connues, observées avec des fibres de carbone macroscopiques de structure similaire.¹³⁴

II.A.5. Hémocompatibilité

Dans les normes en vigueur pour l'évaluation biologique des dispositifs médicaux (normes de la série NF ISO 10993), l'hémocompatibilité doit être évaluée pour les dispositifs médicaux implantés ou communiquant avec l'extérieur, en contact direct ou indirect avec le sang. De plus, la propension des nano-objets à accéder à la circulation sanguine et à interagir avec les éléments biologiques accentue d'autant plus l'importance de cette étude.¹ Or toute surface artificielle est habituellement reconnue par l'organisme comme un « Non-Soi » et déclenche alors des réactions de défense non-spécifique du sang, affectant des éléments cellulaires (polynucléaires, érythrocytes, plaquettes..), des protéines plasmatiques (ex : système du complément) et des médiateurs chimiques. Ces réactions conduisent entre autres à des effets de coagulation, de fibrinolyse. Enfin, l'activation plaquettaire et la génération de thrombine sont deux phénomènes synergiques pouvant entraîner une thrombose, signe de la non-hémocompatibilité des matériaux dans le système cardio-vasculaire.

Radomski *et al.* ont montré que les nanotubes de carbone et des nanoparticules de carbone mixtes peuvent induire l'agrégation des plaquettes *in vitro* et accélérer la thrombose vasculaire dans un modèle de rats ayant une thrombose, comme c'est le cas avec les particules fines et ultrafines de pollution urbaine.¹³⁵ Cependant l'absence d'information sur les caractéristiques des nanomatériaux étudiés limite la portée de ces données. En étudiant l'influence de différents paramètres des nanoparticules de polystyrène sur l'hémocompatibilité, Mayer *et al.* ont observé que la taille semble jouer un rôle important.¹³⁶ En effet, les plus petites nanoparticules (20-30 nm) induisent l'hémolyse et l'inflammation. Par contre, ces auteurs ne peuvent conclure quant à une influence de la charge surfacique, observation par ailleurs partagée par d'autres chercheurs concernant l'internalisation par les érythrocytes des nanoparticules en polystyrène, or et TiO₂.^{101, 137}

Bien que les recherches sur l'hémocompatibilité des nanomatériaux soient relativement peu nombreuses, on peut néanmoins distinguer deux mécanismes^{5b, 55g, 136} :

- Mécanisme direct : en provoquant un épaississement du sang, en bloquant des vaisseaux, en endommageant les parois vasculaires ou encore en créant une réaction inflammatoire localisée comme une plaque d'athérome qui réduirait l'écoulement du sang ;

- Mécanisme indirect : en provoquant la libération de médiateurs chimiques inflammatoires qui diffusent dans le sang et induisent des réactions inflammatoires localisées dans les vaisseaux des organes touchés.

A l'inverse, d'autres expériences sur des nanoparticules de vectorisation, comme les nanoparticules à base d'alcool/polysorbate ou de gadolinium, ont plutôt montré leur hémocompatibilité avec des effets mineurs sur le fonctionnement des plaquettes.¹³⁸ C'est pourquoi, en l'état actuel, les données contradictoires et limitées ne permettent pas encore de statuer sur un éventuel effet toxique des nanomatériaux sur le système vasculaire, contrairement aux particules ultrafines des pollutions dont la relation a été clairement établie avec les maladies cardio-vasculaires.¹³⁹

II.A.6. Toxicité systémique

Dans cette partie, nous allons aborder la toxicité systémique des nanomatériaux au cours du temps, c'est-à-dire la toxicité aiguë (24h), subaiguë (24h à 28 jours), subchronique (90 jours par ex.) et chronique (généralement 6-12 mois). Dans les études publiées, l'identification des organes cibles est souvent négligée et la caractérisation des nanomatériaux étudiés est relativement limitée.^{76b} On peut néanmoins retenir de ces études préliminaires un effet toxique systémique faible à modéré, aux doses et voies administrées.¹⁴⁰

Les organes les plus souvent touchés appartiennent au système réticulo-endothélial, incluant le foie et la rate, en accord avec l'observation fréquente de la capture des nanomatériaux par ce système. Le rein est un autre organe habituellement touché, puisqu'il a été identifié dans certaines études de toxico-cinétique comme la voie d'élimination primaire pour de nombreux nanomatériaux dont les nanotubes de carbone et les fullerènes.¹⁴¹ L'accumulation de certains nanomatériaux dans les lysosomes fait craindre leur dysfonctionnement.^{76b} La biopersistance des nanomatériaux non solubles pourrait conduire entre autres à des modifications de la perméabilité lysosomale et des activités enzymatiques, à l'induction de l'apoptose des macrophages. Et *in vitro*, il a été montré que les *quantum dots* participeraient à l'activation des mécanismes d'autophagie.¹⁴² L'autophagie est un processus de dégradation d'une partie du cytoplasme de la cellule par ses propres lysosomes, pouvant contribuer à la mort cellulaire mais aussi représenter un mécanisme de défense cellulaire.

Grâce à leurs propriétés optiques et électriques uniques, les *quantum dots* fluorescents ont montré leur utilité principalement en tant qu'agents d'imagerie et leurs applications devraient se multiplier dans les années à venir. Cependant, l'engouement pour ce nouveau nanomatériau est quelque peu obscurci par leur potentiel toxique, en particulier pour les quantum dots qui contiennent du cadmium. En effet, les *quantum dots* sont souvent constitués d'un noyau métallique de cadmium-sélénium, entouré par une première enveloppe pour les rendre biocompatibles et éventuellement une enveloppe secondaire fonctionnalisée pour un ciblage ou une modification de leurs propriétés biocinétiques. Or les inquiétudes concernent la stabilité de cette structure noyau-enveloppe. Si d'aventure le noyau métallique devait être exposé, les ions cadmium sont connus pour provoquer des effets toxiques aigus et chroniques sur les vertébrés et posent de réels problèmes environnementaux

et sanitaires.⁹⁸ Les *quantum dots* sont un excellent exemple de l'influence de la taille et l'état de surface sur la toxicité systémique des nanomatériaux, car il est possible de suivre leur biodistribution. Dans une étude de toxicité aiguë *in vivo*, Geys *et al.* ont montré qu'à haute dose, les *quantum dots* de CdSe/ZnS avec une fonctionnalisation carboxylique induisaient plus de thromboses pulmonaires que ceux avec des amines.¹⁴³

Les premières études de toxicité se sont concentrées sur les effets locaux, essentiellement pulmonaires et dermiques, avec des conditions expérimentales différentes et des caractérisations parfois insuffisantes des nanomatériaux étudiés. C'est pourquoi, il n'est pas aisé de généraliser et de prédire le profil de toxicité. Le problème est d'autant plus préoccupant pour les nanomatériaux, à cause de leur capacité de migration dans l'organisme et la possibilité d'atteindre des organes jusqu'alors peu accessibles (comme le cerveau). Ainsi il y a un réel besoin de compléter les connaissances sur la toxicité systémique des nanomatériaux, notamment à long terme, avec des méthodes analytiques et des protocoles validés.

II.A.7. Génotoxicité

Dans les normes en vigueur pour l'évaluation biologique des dispositifs médicaux (normes de la série NF ISO 10993), l'analyse de la génotoxicité d'un dispositif médical est une étape-clé dans son évaluation des risques biologiques, car les dommages sur l'ADN peuvent être à l'origine de cancers, mais également avoir des impacts sur le système reproductif et le développement foetal. Il a été montré que certains nanomatériaux peuvent traverser les membranes cellulaires^{55j, 100-102} et par la suite, pénétrer aussi dans les noyaux des cellules. Leur passage peut se faire par diffusion ou transport actif à travers la membrane nucléaire qui possède des pores nanométriques.¹⁴⁴ Une autre possibilité de contact direct des nano-objets accumulés dans les cellules avec l'ADN se produit au moment de la division cellulaire, quand l'enveloppe nucléaire disparaît. Les effets génotoxiques primaires des matériaux conventionnels suivent un mécanisme direct ou indirect, mais des effets génotoxiques secondaires peuvent également survenir, voire des effets indirects (ce dernier point est discuté plus en détail dans la partie II.B.3).

• **Effets primaires directs**

Les nanomatériaux ont des dimensions similaires aux constituants cellulaires et nucléaires. Le diamètre d'un nucléosome est de 10 nm et celui des microtubules est de 25 nm. A titre de comparaison, les brins d'ADN ont une longueur de l'ordre du micromètre et un diamètre de quelques nanomètres, similairement aux nanotubes de carbone. Il est donc envisageable que les nanoparticules pénètrent dans le noyau et interagissent directement avec l'ADN et les protéines nucléaires. Les nano-objets peuvent produire des radicaux libres par réaction avec les constituants cellulaires de même échelle et induire des lésions de l'ADN ou perturber la ségrégation des chromosomes pendant la mitose (potentiel aneugène). Le processus de division cellulaire en serait potentiellement perturbé et le trafic cellulaire désorganisé.^{55c} Notamment, la présence des nanoparticules de silice dans le noyau a conduit à la formation d'agrégats de protéines

intranucléaires, qui ont ensuite entraîné l'inhibition de la réplication, de la transcription et de la prolifération cellulaire.¹⁴⁶

• **Effets primaires indirects**

L'effet génotoxique peut également provenir d'un mécanisme indirect, impliquant soit un effet pro-oxydant, soit une inhibition de la réparation de l'ADN. Lorsque l'état d'équilibre redox fragile entre les antioxydants et les espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) est rompu, le phénomène de stress oxydatif est déclenché. Les lésions oxydatives endogènes de l'ADN ou celles en rapport avec la chaîne respiratoire mitochondriale augmentent, conduisant à la production de ROS et à l'arrêt de la synthèse d'ATP. Les nanoparticules d'oxydes métalliques sont particulièrement concernées par ces phénomènes, car les ions métalliques libérés sont susceptibles de catalyser la conversion des molécules métaboliques en radicaux libres.

La deuxième conséquence de l'effet génotoxique primaire indirect concerne la réparation de l'ADN. Or, l'échec du processus de réparation pourrait mener à des effets mutagènes et cancérigènes. Lorsque l'ADN est endommagé, une protéine effectrice clé, la p53, est activée. Si les lésions sont trop importantes, la protéine p53 déclenche alors l'apoptose de la cellule. L'activité de cette protéine est donc un bon indicateur de l'effet génotoxique.

C'est ainsi qu'Ahamed *et al.* ont déterminé l'effet génotoxique des nanoparticules d'argent, qui induisent une augmentation de l'expression de p53 dans des fibroblastes et des cellules souches embryonnaires.¹⁴⁷ Ces résultats indiqueraient que l'exposition à des nanoparticules d'argent pourrait conduire à des dommages de l'ADN. Il a en effet été montré que les nanoparticules d'argent pouvaient pénétrer dans le noyau.¹⁴⁸ AshaRani *et al.* ont proposé un mécanisme de type primaire indirect. Les lésions à l'ADN observées seraient liées notamment au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, à une augmentation de la quantité de ROS. Cependant, pour le moment, la capacité des nanoparticules d'argent à promouvoir le stress oxydatif est encore discutée et le mécanisme de leur génotoxicité reste mal connu.¹⁴⁹ De manière générale, actuellement, il est toujours difficile de déterminer si les nanoparticules étudiées (de tout type) interagissent directement avec l'ADN ou non.¹⁵⁰

• **Effets secondaires**

L'endocytose et/ou la phagocytose des nano-objets peuvent aussi conduire à des lésions additionnelles et secondaires de l'ADN. Ces effets secondaires principalement liés à l'inflammation proviennent du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire, déclenchés par les nano-objets. Les espèces radicalaires formées, tels que les radicaux hydroxyles, peuvent réagir avec les acides gras polyinsaturés initiant ainsi une peroxydation lipidique, qui peut conduire à la formation d'adduits à l'ADN. Les lésions de l'ADN prennent aussi la forme de fragmentation chromosomique et de points de mutations.

Si la taille et la chimie de surface influencent la réponse biologique, la composition chimique semblerait également jouer un rôle important dans le degré de la réponse résultante.¹⁴⁹ Dans une étude *in vitro* publiée par Papageorgiou *et al.*, les nanoparticules de cobalt-chrome suivraient un

mécanisme génotoxique différent de leurs homologues microparticulaires sur les fibroblastes.¹⁵¹ Les lésions d'ADN plus importantes observées seraient probablement dues à des effets secondaires liés à des phénomènes inflammatoires.

L'inflammation peut induire la production d'acide hypochloreux par l'intermédiaire de la myéloperoxydase des polynucléaires neutrophiles. Or, les ions hypochloreux sont des inhibiteurs de la réparation de l'ADN par le mécanisme d'excision resynthèse en particulier en bloquant l'expression de certains gènes impliqués dans ce mécanisme.¹⁵²

• **Evaluation de la génotoxicité des nanoparticules**

On dénote actuellement des divergences dans les conclusions des publications, qui rendent leur interprétation difficile.^{55b, 55g, 149-150, 153} Plusieurs raisons permettent d'expliquer ces différences. Généralement, dans de nombreuses études de toxicité publiées jusqu'à présent, le manque de précision dans la caractérisation physico-chimique des nanomatériaux étudiés et les différences entre les conditions expérimentales (ex. : unités, doses...) rendent les comparaisons ardues. Ainsi, plus en génotoxicité qu'ailleurs, on remarque des exemples de résultats apparemment contradictoires sur les mêmes nanomatériaux.¹⁴⁹⁻¹⁵⁰ L'évaluation de la génotoxicité est rendue difficile par la diversité des méthodes expérimentales employées.

C'est pourquoi, il est fortement conseillé de bien caractériser les nanomatériaux étudiés, de choisir les lignées cellulaires et les protocoles les plus adaptés à l'objectif de l'étude, car les modèles inappropriés peuvent générer des résultats non pertinents et non extrapolables à l'Homme. Sans un contrôle rigoureux des paramètres expérimentaux, il serait difficile d'identifier les facteurs influençant la toxicité observée. Pourtant, il serait fort utile de distinguer si la génotoxicité des nanomatériaux observée est propre à l'élément chimique ou à la dimension nanométrique. Pour le cobalt, une étude attribue l'effet génotoxique observé aux ions provenant des nanoparticules métalliques.¹⁵⁴

II.A.8. Cancérogénicité

Bien qu'il existe un certain nombre d'études montrant la capacité des nanomatériaux à induire des lésions de l'ADN, peu de données sont disponibles sur leur potentiel cancérigène. Une étude comparant les nanomatériaux avec leurs homologues conventionnels (matériaux massifs) a montré que les métaux de dimension nanométrique induisent un effet cancérigène, alors que les matériaux massifs ne provoquent qu'une réaction inflammatoire chronique de type granulomateuse, typique contre un corps étranger.¹⁵⁵

Un processus de génotoxicité ainsi qu'une inflammation chronique peuvent aboutir à terme à un effet cancérigène. Le spectre des effets cancérigènes des matériaux fibrillaires persistants comme l'amiante cause des inquiétudes quant aux nanotubes de carbone de structure similaire.^{55g, 156} Effectivement, certains chercheurs ont montré sur des souris que des nanotubes de carbone multifeuilletts longs peuvent induire des mésothéliomes dans la cavité abdominale (péritoine, tissu comparable à la plèvre).¹⁵⁷ Tous ces auteurs ont insisté notamment sur l'importance de la bio-

persistance et la taille des nanotubes de carbone étudiés dans le phénomène cancérigène, tout comme pour l'amiante. C'est d'ailleurs une explication avancée par Muller *et al.*, qui n'ont pas réussi à prouver un effet cancérigène *in vivo* après 2 ans d'étude : les nanotubes de carbone multifeuillets utilisés dans l'expérience ne seraient pas assez longs pour induire des tumeurs.¹⁵⁸ Une discussion plus détaillée sur les effets toxiques et cancérigènes potentiels des nanotubes de carbone sera détaillée ultérieurement (partie II.B.1).

C'est le même phénomène qui expliquerait également la cancérogénicité des nanoparticules de pollution inhalées, faiblement toxiques mais peu solubles (ex. TiO_2).^{55b, 159} La surcharge pulmonaire et l'inflammation chronique due à la biopersistance pourrait conduire à la formation de tumeurs. Les mécanismes possibles incluent des lésions de l'ADN et la production de ROS accompagnant les phénomènes d'inflammation.

II.A.9. Toxicité sur la reproduction et le développement

Les connaissances actuelles sur la toxicité des nanomatériaux sur la reproduction et le développement fœtal sont très restreintes.¹⁶⁰ Les dommages à l'ADN peuvent introduire des mutations, pouvant également contribuer à perturber la reproduction et le développement des générations suivantes. De plus, la grande mobilité des nanoparticules permettrait leur passage dans les organes reproducteurs et à travers la barrière placentaire.

Des chercheurs ont suivi des nanoparticules d'or radiomarquées injectées chez des rats femelles en gestation. Certains scientifiques ont pu détecter dans les fœtus une très faible quantité de nanoparticules d'un diamètre de 5 et 30 nm (0,005-0,018% de la dose injectée).¹⁶¹ Mais d'autres n'ont pas décelé le passage de nanoparticules radiomarquées¹⁶² ou de nanoparticules non radiomarquées de 4 et 40 nm.¹⁶³

Une étude *in vitro* sur des nanoparticules de polystyrène a cependant montré un passage possible à travers le placenta, selon la taille des nanoparticules.¹⁶⁴ De même, les *quantum dots* pouvaient aussi traverser cette barrière, même avec un revêtement en silicium ou en PEG.¹⁶⁵ Les nanoparticules de TiO_2 injectées en sous-cutané chez des souris femelles ont provoqué chez les souriceaux des perturbations de la spermatogenèse, des changements histologiques de leurs testicules et des modifications de l'expression des gènes du cerveau.¹⁶⁶ Des nanotubes de carbone injectés par voie intraveineuse dans la queue de souris mâles adultes ont provoqué des dommages réversibles sur les testicules et généré des ROS, sans pour autant changer les concentrations hormonales, ni la fertilité des rongeurs.¹⁶⁷

Ainsi, les effets sont très variables d'un type de nanomatériau à un autre¹⁶⁰. Par conséquent, on ne peut pas généraliser les résultats des études menées sur un type de nanomatériau à tous les nanomatériaux déjà utilisés dans des dispositifs médicaux (ou ailleurs).¹⁶⁰ Très peu d'études ont démontré un effet tératogène ou reprotoxique, malgré un nombre croissant d'études montrant un passage possible des nanoparticules à travers la barrière placentaire. Les quelques effets

reprotoxiques observés actuellement semblent être relativement mineurs ou peu concluants, mais le risque n'en est pas pour autant écarté.

II.A.10. Neurotoxicité

Le Système Nerveux Central (SNC) est imperméable à un grand nombre de molécules, grâce à la barrière qui sépare les vaisseaux sanguins de l'espace extracellulaire du tissu nerveux (barrière hémato-encéphalique). Cette barrière protectrice est constituée essentiellement de cellules endothéliales, liées entre elles par des jonctions serrées qui empêchent la diffusion des molécules, même de petite taille, comme les ions. De plus, l'accès au tissu cérébral est régi par plusieurs systèmes actifs de transport sélectif, notamment les canaux ioniques. La barrière hémato-encéphalique n'est donc pas uniquement un obstacle physique s'opposant passivement au passage des substances indésirables, mais est un filtre extrêmement sélectif, limitant l'accès aux molécules très lipophiles.⁸⁷

• Risque d'exposition du SNC aux nano-objets

La neurotoxicité des métaux a notamment attiré l'attention sur le risque présenté par des nano-objets. Tout d'abord, après implantation dans le cerveau d'un DM contenant des nanomatériaux, il peut exister un risque d'accumulation de substances potentiellement dangereuses à terme pour le patient, le cerveau étant un milieu clos ne laissant que peu de substances entrer et sortir. D'autre part, les débris contenant des nanoparticules d'usure de dispositifs médicaux implantés (hors cerveau) peuvent se trouver dans la circulation sanguine et font craindre leur migration possible jusqu'au cerveau et voire entraîner un risque de neurotoxicité.

• Capacité des nanoparticules à franchir la barrière hémato-encéphalique

Sous les conditions normales, le passage des nano-objets à travers la barrière hémato-encéphalique est faible.^{55a, 104, 168} Cependant, une perturbation de cette barrière ou des systèmes de transports sélectifs en cas de maladies ou de malformations génétiques de cette barrière pourrait permettre cette pénétration. En particulier sa perméabilité aux nano-objets est augmentée *in vivo* dans le cas de certaines situations physiopathologiques, comme l'hyperthermie, aggravant même le processus pathologique.¹⁶⁹

Les nanoparticules d'or d'une dizaine de nanomètres, de part leur grande mobilité, seraient plus facilement transportées à travers la barrière, par diffusion passive ou par endocytose médiée par des transporteurs, y compris les systèmes actifs de transport sélectif.^{92, 170}

Des nanomatériaux peuvent également se frayer eux-même le passage en altérant la barrière. En effet, les propriétés de surface particulières des nanoparticules, en particulier métalliques, pourraient aussi leur permettre d'interagir avec les membranes des cellules épithéliales de la barrière hémato-encéphalique et provoquer leur altération et la dégénération neuronale.¹⁷¹ Il est intéressant de noter que dans cette étude *in vivo*, les nanoparticules de cuivre et d'argent étaient plus toxiques que les nanoparticules d'aluminium, pourtant de même taille (50-60 nm). En termes mécanistiques,

d'après les études *in vitro*, il semblerait que les dommages portés à la barrière par les nanoparticules seraient liés à leur capacité à déclencher le stress oxydatif, de générer des espèces réactives de l'oxygène et de provoquer l'inflammation et certaines pathologies neurodégénératives.⁷⁵

● **Accès direct des nanoparticules inhalées**

Par contre, pour les nanoparticules inhalées, il existe une autre voie d'accès au SNC, plus directe. Des études *in vivo* ont montré que les nanoparticules déposées sur l'épithélium olfactif et nasal peuvent subir une migration vers le SNC, *via* le nerf olfactif et accéder directement au cerveau, mais ce mécanisme restant encore à être confirmé chez l'homme.¹⁷² Malgré la différence physiologique et anatomique entre le rat et l'homme, le système olfactif des rats étant bien plus développé, la possibilité de pénétration au cerveau humain des nanoparticules inhalées par voie olfactive ne peut être écartée.^{76b}

● **Risque neurotoxique des nanoparticules**

Bien que les conséquences pathologiques d'une migration et accumulation des nano-objets dans le cerveau sont encore mal connues, on pourrait néanmoins envisager la possibilité de formation d'œdèmes cérébraux pouvant mener à des lésions cérébrales et des pathologies neurologiques. Par ailleurs, si la capacité des nanoparticules à entrer dans le SNC inquiète, elle est également porteuse d'espoir car c'est également une voie d'exploration pour la vectorisation de traitements vers cet organe difficilement accessible pour traiter des maladies neurologiques.¹⁷³

II.B. Etat des connaissances sur l'évaluation toxicologique de certains nanomatériaux

Plusieurs nanomatériaux sont utilisables dans les dispositifs médicaux (nanoparticules d'or, nanodiamant, silice nanométrique, oxydes de fer, hydroxyapatite nanométrique, titane nanométrique, etc.). Toutefois, nous avons choisi volontairement de développer l'évaluation toxicologique que pour trois d'entre eux :

- les nanotubes de carbone (dont l'utilisation dans les DM est en cours de développement),
- les nanoparticules d'argent (qui sont utilisées dans des DM commercialisés),
- les nanoparticules issues de débris d'usure et de dégradation de dispositifs médicaux.

II.B.1. Nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone bénéficient d'une attention particulière au regard de leur toxicité potentielle, à cause de leurs propriétés biologiques uniques, qui sont en même temps aussi à l'origine des fortes potentialités du nanomatériau en médecine. Pour le moment, l'utilisation des nanotubes de carbone dans les dispositifs médicaux est au stade du développement. A notre connaissance, il n'y a pas encore de dispositif médical commercialisé.

Un nanotube de carbone (NTC) est composé d'un ou de plusieurs feuillets de graphène roulés les uns sur les autres pour former une structure cylindrique. Les nanotubes de carbone s'avèrent être intéressants en médecine pour leur rapport longueur sur diamètre relativement important. En effet, de dimensions similaires aux brins d'ADN, les nanotubes de carbones peuvent interagir plus efficacement avec les matériaux biologiques, car opérant à la même échelle. Les surfaces de ces NTC peuvent facilement être fonctionnalisées pour moduler leur comportement biologique, améliorer leur biocompatibilité et aussi pour des applications potentielles dans les traitements anti-infectieux (en développement).¹⁷⁴ Les propriétés physico-chimiques particulières des nanotubes de carbone permettent d'envisager leur utilisation dans la reconnaissance et la détection moléculaire à haute sensibilité. En particulier, leur forte absorbance optique en fait de bons candidats pour le traitement du cancer. En conséquence, comme pour tout produit de santé, les risques des effets toxiques doivent être évalués à la lumière des bénéfices potentiels.

Cependant, à cause de leur forte ressemblance fibrillaire avec l'amiante, les risques toxicologiques des nanotubes de carbone sont l'objet de préoccupations.¹⁷⁵ Bien que des résultats préliminaires ont montré que certains NTC utilisés actuellement pouvaient induire une toxicité par voie respiratoire dans les conditions expérimentales étudiées, il est difficile d'établir un consensus clair sur leur toxicité, à cause des différences dans les matériaux et dans les conditions opératoires des travaux publiés.^{175a, 175c}

Certaines études ont montré que les NTC peuvent provoquer une réaction granulomateuse et une inflammation pulmonaire, voire des fibroses pulmonaires.^{83, 157a, b176} Cette toxicité pulmonaire aurait également des incidences cardiovasculaires.¹⁷⁷ Au niveau cellulaire, Porter *et al.* ont observé par microscopie électronique à transmission et confocale l'internalisation des nanotubes de carbone monofeuillets SWCNT.¹⁷⁸ La cytotoxicité des NTC proviendrait du stress oxydatif pouvant entraîner une génotoxicité.¹⁷⁹ Enfin, c'est surtout la biopersistance de ces nanomatériaux dans les poumons^{83, 180} qui inquiète, car elle pourrait, tout comme l'amiante, être à l'origine de mésothéliomes observés par certains chercheurs.^{157a, b} A l'inverse de ces données de toxicité, d'autres travaux ont montré que les NTC seraient tolérés localement après instillation intra-trachéale chez des rats¹⁸¹ et non cancérigènes après injection par voie intrapéritonéale.¹⁵⁸

Il semblerait que la toxicité dépende des caractéristiques intrinsèques des NTC, comme la longueur, la forme¹⁸² et l'état d'agrégation.¹⁸³ Les NTC courts seraient phagocytés par des macrophages et seraient plus facilement éliminés que les fibres longues et ne présenteraient donc pas de toxicité.^{157a} Par exemple, Müller *et al.* ont montré que plus de 80% des nanotubes de carbone multi-feuillets (MWCNT) de 5,9 µm en longueur sont encore présents dans les tissus pulmonaires des rats après deux mois, contre 36% pour les MWCNT de 700 nm.⁸³ Concernant l'état d'agrégation, les SWCNT dispersés, administrés par voie intra-trachéale, ne provoqueraient pas de réactions granulomateuses, contrairement aux SWCNT agrégés.¹⁸³ Les résultats de toxicité dépendraient également de la différence physico-chimique entre les nanotubes de carbone étudiés (fonctionnalisés ou non).⁸⁶

La contradiction des résultats des différentes études peut aussi provenir de la disparité des conditions expérimentales.⁸⁶ Certaines doses administrées ont été critiquées car trop élevées et peu réalistes cliniquement.¹⁸⁴ De plus, il est important de garder à l'esprit que certaines expériences ont été réalisées sur des nanotubes de carbones sous forme d'agrégats et qu'ils ont été administrés par inhalation intra-trachéale ou instillation pharyngée non naturelle. Ces agrégats, du fait de leur taille importante, n'auraient pas été respirables. Ainsi, les résultats expérimentaux de toxicité ne reflètent pas forcément l'exposition par voie respiratoire en situation réelle.^{76b}

De plus, il semblerait que certains résultats de toxicité soient faussés et d'autres dépendraient des procédés de fabrication des NTC.⁸⁶ D'une part, les nanotubes de carbone interagiraient avec certains agents colorimétriques des tests de toxicité utilisés comme le MTT, donnant des faux positifs.¹⁰⁸ D'autre part, même si des chercheurs testent la cytotoxicité des nanotubes de carbone par d'autres méthodes non colorimétriques, leurs résultats de toxicité seraient tempérés par la possibilité de contamination métallique, qui amplifierait la cytotoxicité observée.¹⁸⁵ Kagan *et al.* ont postulé que les résidus de fer utilisés comme catalyseur dans la production des NTC augmenteraient le stress oxydatif, en comparant la réponse inflammatoire des macrophages entre des nanotubes de carbone SWCNT contaminés et des SWCNT purifiés.¹⁸⁶ Il est à noter que l'induction de mésothéliomes a été observée sur des nanotubes de carbone bruts, non purifiés.^{157a, b} Il semble que les défauts surfaciques pourraient aussi être à l'origine d'effets toxiques pulmonaires observés.¹⁸⁷

Au vu des résultats préliminaires de toxicité, bien que contradictoires,^{55h} il semble exister un risque d'effet toxique pulmonaire de type « fibre » similaire à l'amiante pour les nanotubes de carbone, avec des incidences possibles de génotoxicité et de cancérogénicité dues à l'inflammation pulmonaire. Les études expérimentales sont indicatrices d'un danger, mais le risque cancérogène pour l'Homme ne peut être considéré comme démontré, compte tenu des limitations expérimentales.¹⁸⁸ Tous les nanotubes de carbone inhalés ne provoquent pas forcément les symptômes semblables à l'amiante. La taille et la forme sont des paramètres importants dans la toxicité, en plus des impuretés et des défauts surfaciques. Actuellement, on ne peut tirer de conclusion définitive en matière de caractérisation du potentiel toxique étant donné la grande variété physico-chimique des nanotubes de carbone étudiés.¹⁸⁸

Les études de toxicité des nanotubes de carbone sont peu nombreuses pour d'autres voies d'exposition. Les articles publiés montrent plutôt l'innocuité du nanomatériau, en particulier par contact dermique¹³² et par voie intraveineuse.¹⁸⁹ Des dommages réversibles ont été rapportés sur les testicules des rats sans toutefois affecter leur fertilité.¹⁶⁷ Des études *in vitro* confirment notamment l'absence d'effets toxiques des nanotubes de carbone hautement purifiés sur des cellules cardiaques¹⁹⁰, sur les ostéoblastes et fibroblastes.¹⁹¹ Bien que le foie semble être un site d'accumulation préférentiel,^{175a} l'essentiel des nanotubes de carbones mono-feuillets, administrés par injection intraveineuse et suivis par radiomarquage⁹⁶ ou fluorescence¹⁸⁹, seraient éliminés rapidement par la voie rénale.

Par conséquent, il faut rester prudent lors de l'interprétation des résultats et identifier précisément les facteurs responsables de la toxicité observée, dans le cadre de l'utilisation prévue du nanomatériau, tout en se gardant des faux positifs. Il reste encore de nombreuses lacunes dans la connaissance de la toxicité des nanotubes de carbone, surtout dans les cas d'exposition par d'autres voies plus fréquemment rencontrées pour les dispositifs médicaux que la voie pulmonaire.

Néanmoins, les NTC pourraient présenter de réels intérêts pour des applications en médecine. Les bénéfices liés à leur utilisation devront dans ce cas être évalués *versus* les risques potentiels.

II.B.2. Nanoparticules d'argent

L'argent est utilisé depuis l'Antiquité, en particulier dans les produits de santé et présente de manière générale peu de risques pour l'Homme, que l'exposition soit par voie respiratoire, orale, cutanée ou intraveineuse.^{55c, 192}

Les ions argent, issus de la dissolution de l'argent métallique en milieu biologique, seraient responsables de l'activité bactéricide⁴⁶ et sembleraient être biologiquement plus actifs que l'argent métallique.^{55c, 193} Le mécanisme d'action exact est encore mal connu à ce jour, mais il semble que les ions se lient facilement aux protéines et aux résidus d'acides aminés, interagissent avec les membranes des cellules et peuvent dénaturer irréversiblement les bactéries et les virus, d'où leur utilité en tant qu'agent anti-infectieux et antiviral. L'activité bactéricide des nanoparticules d'argent dépendrait de la taille et de la forme, puisque l'interaction de ces nanoparticules avec les membranes bactériennes est influencée par leur surface spécifique.¹⁹⁴ Les nanoparticules de moins de 10 nm seraient les plus réactives,^{194a} tout comme les formes triangulaires tronquées.

Certaines études montrent que les nanoparticules d'argent métallique auraient une action anti-inflammatoire, notamment en induisant sélectivement l'apoptose des cellules en inflammation, et favoriseraient aussi la cicatrisation des plaies¹⁹⁵, alors que les ions d'argent, eux, n'auraient pas d'activité anti-inflammatoire. L'existence ou non d'un revêtement de surface (coating) sur la nanoparticule d'argent modifie aussi sa vitesse de solubilisation et ses propriétés biologiques. Des recherches plus fondamentales sur les mécanismes d'action des nanoparticules d'argent ont révélé le potentiel de ce nanomatériau à favoriser le stress oxydatif, pouvant aboutir à l'apoptose. En interagissant avec les protéines et les enzymes possédant des groupements thiol, les nanoparticules d'argent peuvent perturber le fonctionnement des mitochondries.¹⁹⁶ Elles induiraient également des lésions à l'ADN, suggérant une génotoxicité, mais les données actuelles ne sont pas suffisamment solides pour l'affirmer.¹⁴⁹ En comparant l'activité des nanoparticules (13 nm) avec les microparticules (2-3 µm) d'argent, une étude *in vivo* suggère que le passage de la dimension micrométrique à nanométrique contribuerait à une plus forte induction d'apoptose.¹⁹⁷

Les effets indésirables comme l'allergie ou l'intoxication par l'argent (argyrisme), sont connus et maîtrisés. Phénomène rare, l'argyrisme est dû à une exposition prolongée par ingestion et inhalation, conduisant à des dépôts d'argent dans la peau (argyrie) qui donnent une coloration bleue à la peau et aux muqueuses secondaires ou dans l'œil (argyrose). Généralement, les ions d'argent, issus de l'ionisation de l'argent métallique dans des milieux comme les liquides corporels ou les exsudats tissulaires, sont facilement absorbés par l'organisme, se retrouvent rapidement dans la circulation systémique, avant d'être éliminés par le foie et les reins.

Si la toxicité des nanoparticules d'argent métallique par voie pulmonaire et par voie orale est documentée, moins de données existent sur les risques en cas d'exposition par voie cutanée, pourtant d'intérêt particulier compte tenu des dispositifs médicaux commercialisés ou en développement (pansements, textiles médicaux).

Concernant l'absorption cutanée, des études *in vitro* sur peaux humaines ont montré une faible absorption à travers la peau intacte alors que dans le cas d'une peau lésée, la pénétration systémique des nanoparticules d'argent est possible,⁷⁸ voire importante. D'ailleurs, il a été rapporté le cas d'un jeune patient avec de graves brûlures, qui a développé une hépatotoxicité et une argyrie au bout d'une semaine de traitement local avec des pansements Acticoat[®].¹⁹⁸ Cependant, ces effets se sont avérés réversibles dès l'arrêt du traitement.

Bien que des études cliniques pointent plutôt vers une biocompatibilité dermique des pansements à base de nanoparticules d'argent,^{29, 199} certaines études *in vitro* montrent que les nanoparticules d'argent auraient des effets cytotoxiques sur les kératinocytes et les fibroblastes.²⁰⁰ Néanmoins, il semble difficile de comparer les données obtenues *in vivo* sur la peau (qui est couverte de la couche cornée) et celles obtenues sur des kératinocytes ou des fibroblastes. De plus, Poon *et al.* reconnaissent que la sensibilité des cellules à l'activité toxique de l'argent (métallique et ionique) diminue lorsque l'environnement biologique se complexifie pour mimer les conditions cliniques.^{200b}

Une autre voie d'exposition à l'argent sous forme nanométrique est son incorporation dans le revêtement des dispositifs médicaux invasifs de type chirurgical.²² Une étude *in vitro* sur l'impact d'un revêtement de nanoparticules d'argent dans un cathéter veineux a montré que l'activité antimicrobienne du cathéter s'accompagnait d'une accélération de la coagulation sanguine et a mis en évidence un risque de thrombose.²⁰¹ De même, l'étude clinique AVERT sur des valves cardiaques enduites d'argent métallique Silzone pour réduire les risques d'endocardite a dû être arrêtée au bout de 2 ans, en raison de cas de thromboses et de fuites de valve observés chez plusieurs patients. Le revêtement de polymère imprégné d'argent métallique possédait une épaisseur de 400 nm. Les résultats semblaient relier les effets toxiques observés à cette fine couche argentique Silzone, même si les données ne sont pas statistiquement significatives.²⁰²

Finalement, l'utilisation des nanoparticules d'argent pour leur activité bactéricide soulève la crainte des risques croissants sur la sécurité sanitaire, car elle est de plus en plus exploitée dans des applications médicales. C'est le cas aussi dans des produits de grande consommation, augmentant ainsi considérablement l'exposition à l'Homme et plus généralement aux écosystèmes. Toutefois, ces questions d'ordre général sont en dehors du champ de ce rapport qui se limite aux risques potentiels pour un patient exposé à un dispositif médical contenant de l'argent métallique sous forme nanométrique.

II.B.3. Nano-objets issues de débris d'usure et de dégradation

Des nanomatériaux peuvent être retrouvés chez des patients ayant un dispositif médical. Ils pourraient provenir d'impuretés et de résidus de fabrication. Le cas des débris d'implants dentaires dans la voie gastro-intestinale ayant été abordé dans le chapitre II.A.2, nous développerons ici les effets biologiques des nanoparticules libérées par les prothèses articulaires (hanche, genou, épaule, cheville, discale, trapézo-métacarpienne...). Des particules de dimension micro- et nanométrique ont ainsi été détectées à proximité des implants à couple de frottement, des ciments ou des composites. Les couples sont principalement de type métal-polyéthylène, métal-métal, polyéthylène-céramique ou céramique-céramique.

Les prothèses articulaires implantées subissent de nombreuses contraintes qui les usent et les dégradent : frictions et abrasions entre surfaces articulaires, micromouvements à l'interface avec l'os, corrosion et/ou érosion. Le taux d'usure du polyéthylène est généralement de l'ordre de 100 $\mu\text{m}/\text{an}$, générant des milliards de particules de quelques micromètres.²⁰³ Par contre, les débris métalliques sont de plus petite taille, comprise entre 10 et 90 nm (moyenne autour de 50 nm) et sont libérés à un taux de 10^{12} - 10^{14} particules par an dans un couple métal-métal.²⁰⁴ Cependant, il est possible que la quantité de nanoparticules d'une taille inférieure à 50 nm soit sous-évaluée, du fait des limites de détection des appareils actuels. A titre d'exemple, une étude sur les mécanismes de formation de particules d'usure dans des joints métal-métal, a montré que des nanoparticules globulaires et en forme d'aiguille sont libérées *in vivo*.²⁰⁵ Or, ces auteurs ont remarqué que l'origine de chaque type de nanoparticule est différente. Les nanoparticules globulaires proviendraient des nanocristaux détachés de la couche nanocristalline à la surface, alors que les nanoparticules en forme d'aiguille résulteraient de la fracture de la martensite, qui est un constituant de l'acier trempé.

● *Toxico-cinétique des débris d'implants*

Les débris d'usure sont classiquement phagocytés par des macrophages qui les transportent jusqu'aux ganglions lymphatiques pour excréation.²⁰⁶ Lorsque cette voie d'élimination est surchargée, les particules et les macrophages sont retenus localement et il s'y produit une réponse inflammatoire de type granulomateuse périprothétique. La phagocytose est un processus dynamique dépendant de la taille des particules étrangères, qui est en général supérieure à 500 nm. Les très grosses particules,

de plus de 10 micromètres, stimulent la formation de cellules géantes multinucléées. Pour les particules nanométriques, elles peuvent subir une pinocytose, qui est une endocytose non spécifique.

La mobilité des nanoparticules est aussi illustrée dans la dissémination des particules d'usure et de dégradation d'implants, surtout si ces derniers sont mal fixés.²⁰⁷ En effet, on en trouve distribuées systématiquement dans l'organisme, naturellement dans les tissus synoviaux (os, cartilage, cavités articulaires) et les ganglions lymphatiques, mais aussi dans le foie, la rate et la moelle osseuse.²⁰⁷ Cependant, on ne connaît ni le mécanisme de leur transport jusqu'à ces derniers organes, ni les conséquences de la présence de ces nanoparticules.

Le déclenchement d'une inflammation est une réponse fréquemment observée, mais l'accumulation des nanoparticules provenant des implants peut également perturber le fonctionnement du système immunitaire,²⁰⁸ induire des lésions ostéolytiques périprothétiques, voire conduire au descellement de la prothèse. Leur implication dans le dysfonctionnement immunitaire fait craindre une réaction d'hypersensibilité. Enfin, ces nanoparticules métalliques seraient responsables de la nécrose de ganglions lymphatiques.²⁰⁷ Cependant, le mécanisme exact de leur toxicité est mal connu et pourrait faire intervenir leur forme ionique comme métabolite actif.²⁰⁹ Un cas d'hépatite granulomateuse survenue 8 ans après implantation d'une prothèse de hanche en polyéthylène-titane a été décrit.²⁰⁹

● **Nanoparticules de cobalt-chrome**

L'un des matériaux les plus utilisés dans les prothèses est l'alliage cobalt-chrome, par conséquent des nanoparticules de cobalt et de chrome provenant de l'usure et la dégradation de ces implants pourraient être présentes dans l'organisme. Or, le potentiel génotoxique et cancérigène du cobalt est particulièrement documenté pour les formes ioniques, comme l'ion Co^{2+} .²¹⁰ En revanche, le caractère génotoxique et cancérigène des nanoparticules de cobalt est peu investigué.

La cancérogénicité du chrome et du cobalt ont été intensivement étudiées ces dernières années et a fait l'objet d'une évaluation par l'IARC (*International Agency for Research on Cancer*) en 1990 pour le chrome et en 1991 pour le cobalt.²¹¹ Le chrome métallique et les sels trivalents de chrome ont été classés en groupe 3 (agent inclassable quant à sa cancérogénicité), tandis que les sels hexavalents de chrome ont été classés en groupe 1 (agent cancérigène). Concernant le cobalt, devant des preuves tangibles sur animal, mais insuffisantes chez l'homme, cet élément a été classé en groupe 2B, comme substance potentiellement cancérigène pour l'Homme.

L'effet génotoxique *in vitro* et *in vivo* des ions Co(II) proviendrait de la production d'espèces réactives de l'oxygène et l'inhibition de la réparation de l'ADN. Des études tendraient à montrer que la génotoxicité des nanoparticules du métal cobalt proviendrait vraisemblablement de leur dissolution et ionisation.^{151, 154}

Une équipe de chercheurs a montré des dommages à l'ADN, sans mort cellulaire significative, induits par des produits nanométriques et micrométriques issus de l'usure et de la dégradation des prothèses articulaires en Co-Cr, à travers une barrière constituée de plusieurs couches de cellules BeWo, modélisant de façon minimale la barrière placentaire.¹⁴⁵ Ces cellules communiquent entre elles grâce à des jonctions, permettant ainsi soit un passage d'ions cobalt et chrome jusqu'aux cellules des couches inférieures non exposées aux particules, soit la transmission de signaux intracellulaires qui se propageraient jusqu'aux fibroblastes. L'effet génotoxique des nanoparticules de chrome et de cobalt suivrait donc un nouveau mécanisme indirect, transmis par les cellules BeWo. Cet effet est aussi observé avec les microparticules de Co-Cr et ne serait donc pas spécifique de la dimension nanométrique. De plus, les doses utilisées pour déclencher un effet génotoxique sont plus élevées que celles trouvées dans la réalité clinique, comme le reconnaissent volontiers ces chercheurs. Ces résultats mériteraient confirmation par d'autres études concordantes, avant toute conclusion hâtive et généralisation abusive.

• **Nanoparticules de dioxyde de titane**

La surface des implants peut être recouverte d'une couche de dioxyde de titane pour éviter la corrosion et augmenter leur biocompatibilité. L'épaisseur de la couche de dioxyde varie en général entre 1 et 10 μm et sa composition comprend les structures cristallines anatase et rutile. D'une part, elle est très résistante à la corrosion par les ions chlorures. D'autre part, cette couche intermédiaire isole le matériau du milieu environnant. L'épaisseur et la composition de la couche passivante évoluent au cours du temps sous l'influence de l'environnement : au départ c'est le dioxyde de titane TiO_2 , puis par dissolution/reprécipitation, on détecte des mélanges d'oxydes de titane TiO_2 , TiO , Ti_2O_3 , Ti_3O_2 . Détruite partiellement au cours du temps par les attaques chimiques ou mécaniques, la couche se reforme de façon dynamique. *In fine*, le dioxyde de titane étant en contact direct avec le milieu biologique, l'évaluation de la biocompatibilité des nanoparticules de dioxyde de titane issues de la dégradation du revêtement s'avère nécessaire.

Jusqu'à récemment, le dioxyde de titane était considéré comme faiblement toxique. Cependant, depuis février 2006, le CIRC a reclassifié le TiO_2 pigmentaire et ultrafin comme « Agent cancérigène possible pour l'homme » (groupe 2B).²¹² Néanmoins, la toxicité intrinsèque des nanoparticules d'oxyde de titane est encore sujette à débat actuellement. L'ingestion et le contact dermique ne semblent pas engendrer d'effets secondaires (cf. II.A.2).^{55c, 76a, 77, 140} En revanche, des effets toxiques pulmonaires, l'inflammation et des lésions de l'ADN ont été observés chez l'animal avec des nanoparticules de TiO_2 introduites dans le tractus respiratoire. Des études *in vivo* ont montré des signes de toxicité systémique comme une apathie et une léthargie, une perte d'appétit et des tremblements.

Pour les nanoparticules de TiO_2 , il semblerait que la toxicité dépendrait de la structure cristalline, mais aussi de la taille et de l'état de surface²¹³. Inactives catalytiquement, les nanoparticules de rutile sont deux fois moins cytotoxiques que celles d'anatase.²¹⁴ Elles induiraient la nécrose des cellules étudiées, alors que leurs homologues anatases initieraient plutôt l'apoptose des cellules en provoquant la génération des espèces réactives de l'oxygène.^{215, 105}

II.C. Paramètres de caractérisation pertinents pour l'évaluation toxicologique des nanomatériaux

Comme l'impact des nanomatériaux sur les systèmes biologiques n'est encore que partiellement connu, une caractérisation précise est essentielle pour comprendre les facteurs qui déterminent leurs comportements biologiques. Or la composition chimique ou même la taille ne sont plus des facteurs suffisants pour déterminer la toxicité des nanomatériaux, qui dépend de nombreux autres facteurs physico-chimiques (forme, état d'agrégation, état de surface, état électronique, solubilité...). La grande diversité des nanomatériaux complique d'autant plus la tâche d'évaluation et de classification du risque de ces nanomatériaux. A titre d'exemple, on compte actuellement environ 50 000 types différents de nanotubes de carbone, selon la matière première, les procédés de fabrication et les catalyseurs utilisés.^{55g}

Une caractérisation complète des nanomatériaux utilisés est souhaitable, mais implique des investissements en temps, argent et des mises en œuvre qui peuvent devenir complexes. Sur tous les paramètres possibles pour définir un nanomatériau, un consensus général se dégage pour 8 paramètres fondamentaux considérés comme les plus pertinents pour son évaluation biologique^{1, 216} :

- Taille et distribution de taille
- Morphologie
- Etat d'agrégation / d'agglomération
- Solubilité et état de dispersion
- Surface spécifique
- Composition (composition chimique et structure cristallographique, entre autres)
- Charge de surface
- Chimie de surface

Cette approche permettrait une caractérisation minimale et standardisée des nanomatériaux avant d'effectuer tout test toxicologique. Sans description adéquate, les résultats des expériences de toxicité auront une valeur limitée et seront difficilement comparables à ceux obtenus avec d'autres nanomatériaux.

II.C.1. Paramètres physiques

• *Taille, distribution de taille et morphologie*

La taille est le critère sur le quel tout le monde s'accorde pour définir un nanomatériau et un nano-objet. C'est pourquoi il est essentiel de bien caractériser ce paramètre, ce d'autant plus que les notions de dimension et de morphologie sont déterminantes pour évaluer la toxicité des

nanoparticules. Nous avons vu que la toxicité ou l'innocuité des nanotubes de carbone change selon la taille.^{83, 157a, 182}

En plus de la taille, la morphologie du nanomatériau importe. Précédemment, il a été décrit que l'activité bactéricide des nanoparticules d'argent ne dépend pas uniquement de la taille mais aussi de la forme.^{194a} D'après Chen *et al.*, le potentiel cytotoxique des nanomatériaux de TiO₂ dépend de la forme du nanomatériau : si l'oxyde de titane anatase est en bâtonnet (2D), il n'est pas cytotoxique, contrairement à la forme sphérique (3D).²¹⁷

- Méthodes microscopiques

Il existe un certain nombre de méthodes pour déterminer la dimension et la morphologie des nanomatériaux.^{5b, 216d, 218} Parmi les méthodes microscopiques, qui sont les outils les plus puissants pour ces caractérisations, des protocoles de mesure se développent autour de deux instruments majeurs et complémentaires : le microscope à force atomique (*Atomic Force Microscope*, AFM) et le microscope électronique à balayage (MEB ou *Scanning Electron Microscope*, SEM) ou à transmission (MET ou *Transmission Electron Microscope*, TEM).

Depuis de nombreuses années, le MET est utilisé dans les laboratoires de recherche pour l'étude des nanoparticules car sa résolution est sub-nanométrique. Cependant, l'image obtenue est une projection du nano-objet sur un plan, ce qui peut introduire un biais sur la mesure de la taille ou de la morphologie. De plus, dans le cas des matériaux nanostructurés, il nécessite une préparation délicate de l'échantillon à analyser : découpage d'une fine couche pour permettre aux électrons de traverser l'échantillon.

Dans le cas des MEBs, les progrès réalisés dans le domaine des sources et la maîtrise des faisceaux d'électrons permettent aujourd'hui d'atteindre des résolutions latérales légèrement inférieures au nanomètre avec les MEB de dernière génération (par ex : Magellan de FEI), ce qui les rend compétitifs pour la mesure des nanoparticules. De plus, le MEB est un outil de caractérisation très polyvalent avec une grande vitesse de balayage et une très grande gamme de mesure, utilisé sur les lignes de productions industrielles, notamment dans le secteur de la microélectronique. Cependant, la résolution est limitée en hauteur par la déflexion des électrons secondaires récupérés par les détecteurs latéraux et est fortement influencée par de nombreux paramètres : l'énergie des électrons, les propriétés électriques du nano-objet ou son état de charge en surface...

Enfin, l'AFM tient une place privilégiée dans les Instituts Nationaux de Métrologie car il est l'instrument de référence qui permet une mesure directement traçable aux unités du système International (S.I.) à l'échelle du nanomètre. Par balayage d'une fine pointe sur l'échantillon, l'AFM est capable de reconstruire une image tridimensionnelle de la topographie d'une surface aussi bien à l'air ambiant que sous vide ou en milieu liquide. Les résolutions alors obtenues sont inférieures au nanomètre verticalement mais dépendent horizontalement (XY) de la taille et de la géométrie de la pointe (élargissement des motifs observés par la pointe, environ 10 nm).

Dans le cadre des travaux européens sur la normalisation, les méthodes de mesures des nano-objets ou matériaux nanostructurés se développent surtout autour de l'utilisation

complémentaire du MEB (bonne incertitude de mesure en XY) et de l'AFM (bonne incertitude de mesure en Z).²¹⁹ Cette complémentarité permet d'envisager des mesures métrologiques de nano-objets dans les trois directions de l'espace.

Enfin, quelque soit le type d'instrument utilisé, la validité de la mesure doit être établie en vérifiant que les mesures et l'échantillonnage soient significatifs.²²⁰ Le choix des matériaux de référence est aussi déterminant.

- Distribution de taille

La plupart des nanoparticules manufacturées ne sont pas de parfaites sphères homogènes, mais sont généralement un mélange de plusieurs tailles et de morphologies diverses. Dans certaines méthodologies actuelles, la taille d'une nanoparticule est déduite du diamètre d'une sphère équivalente qui donnerait les mêmes propriétés intrinsèques que la particule de forme complexe. Or pour évaluer les risques biologiques des nanomatériaux, il est nécessaire de bien caractériser la diversité et les quantités relatives des tailles présentes dans le mélange étudié. C'est pourquoi on ne peut décrire la taille d'un nanomatériau sans donner également la distribution de taille.

- Mesures dépendantes de la technique et du lot

Les mesures de taille d'une nanoparticule provenant de différentes méthodes de caractérisation ne sont pas forcément comparables car les instruments ne mesurent pas le même mesurande. Les différentes techniques ne mesurent pas la même chose et dépendent de la nature de l'échantillon : en poudre, dispersé dans un liquide, incorporé dans une matrice solide ou avec un revêtement (*coating*). Par exemple, les mesures de taille par MET peuvent ne pas détecter des revêtements organiques, alors que celles par DLS (*Dynamic Light Scattering*) en tiennent compte. Plus précisément, les mesures de DLS sont des mesures du diamètre hydrodynamique des nanoparticules, c'est-à-dire leur diamètre primaire avec la première sphère d'hydratation, alors que le MET ne donne que le diamètre primaire. Domingos *et al.* ont rapporté que la taille mesurée peut considérablement diverger des indications du fabricant selon la technique utilisée.²¹⁸ Il est donc important que toute caractérisation d'un nanomatériau comporte la taille mesurée, l'incertitude de mesure, la distribution de taille observée et les méthodologies utilisées pour la mesure.

- Variabilité des nanomatériaux produits

Les informations fournies par les fabricants de matière première devront être prises avec précaution. En effet, Park et Grassi ont montré qu'un lot commercial de nanoparticules de 30 nm comporte en réalité des nanoparticules de taille allant de 5 nm à 300 nm.²²¹ De la même manière, dans un échantillon de nanoparticules sphériques, ces auteurs ont trouvé tout aussi bien des sphères que des bâtonnets. De plus, les caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux peuvent changer au cours du temps et selon l'environnement.

• Agrégation/Agglomération, solubilité et état de dispersion

Les nano-objets sont susceptibles de changer de taille et de forme une fois dans l'environnement biologique. Or c'est l'état dans lequel se trouve le nano-objet quand il interagit avec

les espèces biologiques, qui conditionne les effets biologiques résultants. Il a été observé que les nanoparticules ont tendance à s'agréger et s'agglomérer en milieu aqueux, perturbant d'ailleurs les mesures de taille.^{216b, c, 218} Lorsque les effets biologiques d'un nanomatériau dépendent de sa taille, alors l'état de dispersion, d'agrégation et d'agglomération du nanomatériau devient primordial.

En effet, des études ont montré que les nanotubes de carbone n'ont pas la même toxicité pulmonaire en tant que fibres dispersées ou agglomérées.²²² Mercer *et al.* ont par exemple observé que les SWCNT dispersés (0,69 μm de diamètre), à cause de leur faible dimension, étaient plus rapidement incorporés dans les interstices alvéolaires des souris après aspiration pharyngéale. Moins bien reconnus par les macrophages, les SWCNT dispersés ont provoqué alors une fibrose généralisée, contrairement aux SWCNT non dispersés (sous forme de pelote de 1,52 μm de diamètre).²²³

Dans les systèmes polydisperses, il est souvent difficile de distinguer si les différents groupes de taille sont ceux des nano-objets primaires ou la taille des agrégats et agglomérats. En milieu aqueux, l'agrégation et l'agglomération des nano-objets sont contrôlées par un équilibre subtil entre les forces de surface et intermoléculaires faisant intervenir des interactions interparticulaires et entre les particules avec leur environnement. De légères perturbations dans le milieu comme le pH, la force ionique ou les concentrations peuvent modifier considérablement l'état de dispersion des nanoparticules.⁶ Ainsi, le comportement d'agglomération des nanoparticules change selon le milieu étudié. Murdock *et al.* ont observé que l'ajout de sérum dans le milieu de culture pouvait conduire dans certains cas à mieux disperser les nanoparticules métalliques.^{216c}

L'état de dispersion est un état dynamique, qu'il faut étudier à différents instants, en faisant des mesures comparatives de distribution de taille par rapport à un état initial de dispersion « idéale », pour connaître qualitativement le degré d'agrégation et d'agglomération.^{216d} On parlera de dispersibilité pour qualifier la capacité d'un matériau (phase dispersée) à être distribué uniformément dans un autre matériau (milieu dispersif ou phase continue, par exemple un liquide porteur). Selon la surface des nano-objets (notamment si elle est fonctionnalisée), il peut y avoir dispersion dans le liquide porteur et dans ce cas, la suspension finale serait plus stable dans le temps.

L'étude dynamique de l'état de dispersion implique une méthode fiable pour mesurer l'état initial, où les nano-objets seraient idéalement dispersés en solution. Diverses méthodes telles que la sonication, des agents dispersifs ou surfactants sont communément utilisés pour la dispersion. Cependant, l'emploi d'un surfactant chimique peut endommager les cellules et interférer avec l'évaluation toxicologique. Par exemple, plusieurs études ont reconnu que le surfactant cationique CTAB (bromure de cetyltriméthylammonium), habituellement utilisé pour stabiliser les nanobâtonnets d'or, serait la principale cause de toxicité de ce nanomatériau.^{94, 224}

De même unité que la dispersibilité, mais faisant appel à des concepts différents, la solubilité est un paramètre indispensable dans l'évaluation des risques biologiques de tout type de matériau. On dit qu'un matériau est dissout lorsqu'une suspension au niveau moléculaire, en une seule phase homogène et temporairement stable dans un autre matériau (le solvant), est obtenue. Les forces d'interaction internes au sein de la nanoparticule sont importantes et peuvent empêcher la dissolution

de la nanoparticule dans son milieu. En revanche, la dispersibilité des nano-objets font appel à des forces externes, entre les nano-objets (effets collectifs). Bien que ces deux paramètres renseignent sur le comportement du matériau à tester en milieu liquide, ils donnent des informations différentes.

L'étude de la biodégradation d'un composé est souvent associée aux notions de solubilité et de persistance. Un nanomatériau insoluble et non-dégradable retiendra particulièrement l'attention, car cela pourrait impliquer une persistance et une accumulation du nanomatériau dans l'organisme et provoquer à termes des effets toxiques chroniques.²²⁵ De même un nanomatériau soluble donnera naissance à des ions qui peuvent eux-mêmes être toxiques. En comparant différentes nanoparticules *in vitro*, Brunner *et al.* ont montré que la solubilité influence la toxicité.²²⁶ Le profil toxicologique d'un nanomatériau, une fois dissout en milieu biologique sous sa forme moléculaire ou ionique, est similaire au matériau massif solubilisé et les risques engendrés sont *a priori* connus grâce au recul clinique avec le matériau massif de même nature chimique. Naturellement, une meilleure connaissance des risques faciliterait l'analyse et la gestion des risques, mais n'exempte en rien leur prise en compte.

Ainsi, l'état d'agrégation et d'agglomération des nano-objets ainsi que la dispersibilité et la solubilité doivent être renseignés, surtout en cas de modifications de propriétés dans les milieux biologiques, car les conséquences toxicologiques peuvent en être affectées.^{216c, 222a}

• **Surface spécifique**

On désigne par surface spécifique la surface exposée d'un matériau, qui est caractérisée par le rapport entre l'aire de la surface sur la masse du matériau étudié ($S = 3/(densité \times rayon)$) et est donc indépendante de la quantité de matière utilisée. On comprend alors que ce paramètre devient particulièrement utile pour décrire les nanoparticules ayant une forte tendance à s'agréger et s'agglomérer. C'est aussi une caractérisation plus pertinente pour les surfaces poreuses, qui possèdent en plus une distinction entre surface externe et surface interne.

Comme les interactions entre les nanomatériaux et les composants biologiques ont lieu au niveau de la surface du nanomatériau, la détermination de la surface spécifique est primordiale pour l'étude des effets toxiques potentiels.²²⁷ La surface spécifique mesurée dépend bien sûr des dimensions et de la morphologie des nanomatériaux. Par exemple, Grabinski *et al.* ont observé nettement plus d'interactions entre les membranes cellulaires avec les nanotubes de carbone monofeuillets, qu'avec les nanotubes de carbone multifeuillets, probablement à cause de la plus grande surface spécifique des nanotubes de carbone monofeuillets selon ces auteurs.¹⁸² Pourtant, plus d'interactions ne signifie pas forcément plus de toxicité car les auteurs n'ont pas remarqué de différence de cytotoxicité entre ces deux types de nanotubes de carbone, bien que d'autres études comparatives aient trouvé une plus grande cytotoxicité chez les nanotubes de carbone monofeuillets.²²⁸ En effet, la toxicité des nanotubes de carbone dépend bien d'autres facteurs, comme nous avons vu précédemment (partie II.B.1).

La surface spécifique des nanomatériaux nanoparticulaires et nanoporeux est souvent mesurée par une méthode d'adsorption gazeuse utilisant la méthode de traitement théorique BET (Brunauer-Emmett-Teller).²²⁹ En raison de la petite taille des molécules gazeuses adsorbées, la surface spécifique mesurée n'est que très peu affectée par le degré d'agglomération des nanomatériaux. Cependant, une des limites de cette méthode est qu'elle n'est valable que pour les poudres et/ou des matériaux solides secs.^{216a, 216d} Il existe également d'autres méthodes comme des titrations de surface ou des chargeurs d'aérosol.²³⁰

Certains auteurs proposent que l'évaluation toxicologique des nanomatériaux en fonction de la surface spécifique soit recommandée en complément à la masse, qui est l'unité de mesure classique.^{1, 55k, 227} Ce point sera développé ultérieurement dans le rapport (partie III.B.2).

II.C.2. Paramètres chimiques

• **Composition et contaminations**

On entend par composition tous les paramètres pertinents pour décrire la composition d'un matériau comme la composition chimique, la structure cristallographique, l'état cristallin, la conformation/configuration moléculaire...

La caractérisation de la composition chimique doit comporter à la fois les substances attendues mais aussi celles inattendues comme les **impuretés**. Comme la surface exposée des nanoparticules est grande, le risque de présence de contaminants adsorbés est accru. Les impuretés peuvent provenir des procédés d'élaboration, de production, de stérilisation et de stockage des produits. Pour les nanomatériaux polymériques, les impuretés rencontrées peuvent être des monomères résiduels, des oligomères des produits de recombinaison (regroupés sous le nom de composés de faibles poids moléculaires), etc.

Les endotoxines, contaminants biologiques, peuvent complètement modifier les résultats toxicologiques. Notamment, Inoue *et al.* ont remarqué que les endotoxines peuvent amplifier de manière spectaculaire l'inflammation pulmonaire des nanoparticules de noir de carbone, qui seules ne provoqueraient que des effets mineurs.²³¹

De même, les contaminants peuvent aussi être chimiques. Des études ont montré que certains effets toxiques des nanotubes de carbone pourraient être attribués aux impuretés de fer¹⁸⁵⁻¹⁸⁶ et d'yttrium.²³²

Par ailleurs, certaines impuretés inhérentes aux protocoles des tests de toxicité peuvent également fausser les conclusions. Par exemple, les résultats d'une étude ayant attribué la capacité d'induire le stress oxydatif à des fullerènes chez certains poissons²³³ ont été critiqués à cause de la présence possible du solvant THF (tétrahydrofurane) résiduel.²³⁴ Des recherches ultérieures ont effectivement confirmé que les effets toxiques observés étaient attribuables au THF résiduel.²³⁵

• **Chimie de surface et charge de surface**

On désigne par chimie de surface les nombreuses propriétés surfaciques qui régissent l'interaction directe des nanomatériaux avec l'environnement, en particulier biologique. La chimie de surface comprend, entre autres, des éléments d'équilibre de solubilité, propriétés catalytiques, état de charge en surface, adsorption et désorption surfacique. Cette chimie de surface dépend particulièrement des molécules présentes à la surface du nanomatériau. Sa description devrait au moins comporter des détails de composition chimique et dans le cas d'un revêtement : l'épaisseur, l'homogénéité, la solidité de l'ancrage avec le noyau... Pour les nanomatériaux polymériques, les composés de faible poids moléculaire peuvent diffuser à la surface, à plus ou moins long terme, en modifiant la chimie de cette dernière.

• Revêtement (coating)

Le choix du revêtement est souvent motivé par l'application prévue pour le nanomatériau. La surface exposée, la solubilité aqueuse et la fonctionnalisation ont des conséquences sur la stabilité, l'état d'agrégation et d'agglomération, mais ont aussi des effets sur l'interaction du nanomatériau avec les molécules biologiques⁵⁶ et donc sur son comportement biologique, telles que leur toxicocinétique ou leur activité biologique.²³⁶ Souvent, les modifications ou fonctionnalisations surfaciques des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux visent à augmenter leur biocompatibilité.

Par exemple, la fonctionnalisation avec du polymère PEG (polyéthylène glycol) est souvent utilisée pour éviter la reconnaissance par les macrophages et la phagocytose, afin de prolonger la circulation dans l'organisme, comme ce qui a été montré avec des nanobâtonnets d'or.²³⁷ La demi-vie de circulation dans l'organisme *in vivo* des *quantum dots* couverts de chaînes méthoxy-PEG courtes (750 Da) est de 12 minutes, contre 70 min pour ceux avec de longues chaînes (5000 Da).²³⁸ Si un enrobage en polysaccharide augmente le pouvoir génotoxique des nanoparticules d'argent sur des fibroblastes et des cellules souches embryonnaires,¹⁴⁷ la fonctionnalisation des *quantum dots* de CdSe de réputation toxique avec une « enveloppe » de ZnS permet de diminuer cet effet cytotoxique,²³⁹ encore faut-il s'assurer que ce revêtement ne se dégradera pas une fois dans l'organisme et ne révélera pas le cœur toxique.

Les molécules de surface peuvent être très dynamiques, échangeant avec les molécules du milieu environnant. Il existe une multitude de possibilités de modifications surfaciques qui ont des impacts majeurs sur les interactions du nanomatériau avec les systèmes biologiques. C'est l'ensemble « cœur » / « enveloppe » qui contrôle le comportement réel du nanomatériau complet. C'est pourquoi l'évaluation des risques biologiques des nanomatériaux se fera préférentiellement sur la combinaison du nanomatériau avec son enrobage, tout en gardant une attention particulière sur la biodégradation possible du revêtement. Si tel est le cas, une étude toxicologique pour les produits de dégradation résultant devra alors également être menée.

• Charge de surface

L'état de charge en surface d'un nanomatériau est utile, car il renseigne sur ses propriétés de dispersion dans le milieu et sur sa capacité d'adsorption des ions et des composants biologiques environnants.^{58b, 60} La toxico-cinétique des nanomatériaux dépend beaucoup de la charge de surface,

qui peut évoluer au cours du temps et en fonction de l'environnement. Notamment, Goodman *et al.* ont montré dans une étude que des surfaces de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des molécules chimiques chargées positivement permettraient une meilleure affinité avec les membranes cellulaires chargées négativement et donc contribueraient à l'action cytotoxique.²⁴⁰

Lorsque les nanoparticules sont en suspension dans une solution aqueuse, elles peuvent être chargées et être entourées par un nuage ionique. La charge électrique résultante, appelée potentiel zêta, est utilisée classiquement pour caractériser indirectement la charge de surface. Le potentiel zêta apparent d'un nanomatériau donné est fonction de l'état de charge surfacique, des espèces adsorbées, du pH, et de la composition ionique du milieu étudié.

Dans l'évaluation des risques biologiques d'un nanomatériau, le potentiel zêta est un bon indicateur de son activité biologique.²⁴¹ De manière générale, un potentiel zêta élevé en valeur absolue indique une meilleure dispersion en solution et une meilleure stabilité et donc moins de probabilité d'agrégation et d'agglomération, voire potentiellement une plus faible toxicité. En effet, dans une étude menée par Hu *et al.*, plus la valeur du potentiel zêta est élevée en valeur absolue, moins les nanoparticules métalliques (ZnO, CuO, Al₂O₃, La₂O₃, Fe₂O₃, SnO₂ et TiO₂, ZnO) étaient cytotoxiques sur les bactéries *E. Coli*.²⁴²

De manière générale, l'évaluation des charges de surface doit être réalisée dans les conditions similaires à celles du traitement (véhicule, milieu de culture, présence de protéines, etc.).

II.C.3. Conclusion

Les huit paramètres présentés permettent une approche centrée sur une évaluation minimale standardisée des propriétés physico-chimiques qu'il est vivement conseillé de caractériser avant toute étude toxicologique des nanomatériaux. De manière générale, les paramètres choisis pour la caractérisation d'un nanomatériau doivent pouvoir renseigner sur trois critères : l'apparence (taille et distribution de taille, morphologie, état d'agrégation/agglomération, surface spécifique), la constitution (composition chimique, chimie de surface) et les facteurs influençant les interactions avec les éléments environnants (solubilité/état de dispersion, charge de surface). Il existe également d'autres paramètres physico-chimiques pertinents tels que l'hydrophobie, le potentiel redox, les propriétés photocatalytiques, le potentiel de formation radicalaire...

On soulignera également l'importance de mener les mesures de caractérisation sur les échantillons les plus représentatifs de la situation (milieu biologique représentatif), avec une validité statistiquement acceptable, tout en précisant la technique utilisée. On se réfèrera aux textes des normes ISO et ceux de l'OCDE pour de plus amples détails sur les méthodologies à adopter pour mener à bien ces caractérisations. Nous attirons l'attention sur le fait qu'il ne suffit pas de s'en remettre aux indications du fournisseur, car les paramètres physico-chimiques du nanomatériau (notamment l'agrégation/agglomération, chimie de surface) peuvent changer au cours du temps. La priorité devra se porter sur la reproductibilité rigoureuse entre lots. On prendra soin de choisir les

méthodes adéquates (analytiques voire biologiques) pour s'assurer de l'uniformité et la reproductivité des lots. Dans le cas contraire, des différences importantes dans les résultats de biocompatibilité et de performance peuvent être observées, pour une simple petite divergence physico-chimique.

III. Les référentiels actuels des dispositifs médicaux sont-ils adaptés aux dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux ?

La réglementation a pour objectif de poser un cadre pour assurer au patient un minimum de risques biologiques potentiels induits par l'utilisation des dispositifs médicaux, au regard des bénéfices médicaux qu'il pourrait en attendre. Ainsi, pour pouvoir mettre sur le marché un dispositif médical, le fabricant doit justifier d'une balance bénéfice/risque favorable. Or, le développement des nanotechnologies suscite à la fois beaucoup d'espoirs avec de nouvelles applications dans le diagnostic et la prise en charge du patient, mais également des interrogations sur de potentiels effets biologiques néfastes, encore mal caractérisés. Devant les propriétés et comportements particuliers des nanomatériaux, souvent différents de leurs homologues de plus grande taille, les méthodes d'évaluation bénéfice/risque et nos procédures de gestion des risques restent-elles applicables aux dispositifs médicaux contenant ces nanomatériaux ?

III.A. Rappel de la réglementation actuelle pour les dispositifs médicaux

La réglementation en vigueur pour les dispositifs médicaux est basée sur plusieurs directives européennes dont les principales sont : la directive 90/385/CE relative aux dispositifs médicaux implantables actifs (DMIA) et la directive 93/42/CE relative aux dispositifs médicaux^{22a} (consolidées récemment par la directive 2007/47/CE^{22b}) ainsi que la directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. L'esprit de ces directives repose sur le principe que la gestion des risques est de la responsabilité du fabricant du dispositif.

Ainsi, pour mettre sur le marché européen des dispositifs médicaux, les fabricants doivent démontrer leur conformité aux exigences essentielles de sécurité sanitaire décrites dans l'Annexe I de ces directives européennes en apportant les preuves de performances et de sécurité du dispositif afin de réduire au minimum les risques associés à l'utilisation par les patients et les utilisateurs.

III.A.1. Directive 93/42/CE et marquage CE

Dans la directive 93/42/CE, les dispositifs médicaux sont classés en fonction du niveau de risque (durée d'utilisation, invasivité, dispositif actif, etc.) selon quatre classes : I pour un risque faible, IIa, IIb et III pour un risque élevé. A titre d'exemple, sont classés en III les dispositifs invasifs ou

implants en contact avec le système nerveux central, avec le cœur ou avec le système circulatoire central, mais également ceux incorporant une substance thérapeutique comme par exemple les nanoparticules d'argent à visée antimicrobienne.

Pour les dispositifs médicaux de classe IIa, IIb, III et les DMIA, la conformité est évaluée par un tiers indépendant appelé organisme notifié, qui en cas de conformité délivre un certificat de marquage CE, permettant au fabricant la mise sur le marché notamment européen. Pour les dispositifs médicaux présentant un potentiel élevé de risques pour la santé humaine (dispositifs de classe IIa, IIb et III ainsi que les DMIA), le fabricant, le mandataire ou le distributeur a l'obligation d'informer l'Afssaps de leur mise en service en France et de fournir un exemplaire de l'étiquetage et de la notice d'instruction (décret n°2002-1221 du 30 septembre 2002 et décret n°2010-270 du 15 mars 2010, correspondant aux articles L.5211-4 et R.5211-66 du Code de la santé publique). Pour les dispositifs médicaux de classe I, il ne s'agit que d'une déclaration à l'Afssaps, concernant uniquement les fabricants ou mandataires dont le siège social se trouve en France. L'Afssaps, en tant qu'autorité compétente dans le domaine des dispositifs médicaux, ne donne pas d'autorisation de mise sur le marché comme c'est le cas pour les médicaments. En amont du marquage CE, elle intervient néanmoins en autorisant les essais cliniques ayant lieu en France. Après commercialisation, l'Afssaps évalue les données de vigilance et assure une surveillance du marché. En cas de besoin, elle prend des mesures de police sanitaire appropriées.

La directive 2007/47/CE, d'application obligatoire depuis mars 2010, a renforcé l'obligation de données cliniques dans les procédures d'évaluation de conformité des dispositifs. Elle introduit également le concept de suivi clinique post-marché (« Post Market Clinical Follow-up ») pour la surveillance des dispositifs après l'obtention du marquage CE.

III.A.2. Norme NF EN ISO 14971 (Gestion des risques)

Les exigences essentielles de sécurité sanitaire des directives européennes relatives aux dispositifs médicaux définissent les résultats à atteindre et les risques à traiter mais ne proposent pas les solutions techniques. L'adéquation aux normes européennes harmonisées, qui sont d'application volontaire, vaut présomption de conformité à ces exigences essentielles. La norme internationale de l'Organisation internationale de normalisation ISO 14971, dont la version française est référencée NF EN ISO 14971, est intitulée « Dispositifs médicaux – Application de la gestion des risques aux dispositifs médicaux ».²⁴³

Cette norme aide le fabricant à établir, documenter et maintenir, tout au long du cycle de vie d'un dispositif médical, un processus continu permettant d'identifier les phénomènes dangereux associés à un dispositif médical, d'estimer et d'évaluer les risques associés à ces phénomènes dangereux, de maîtriser ces risques et de contrôler l'efficacité de cette maîtrise. Le fabricant doit appliquer les principes suivants, dans l'ordre donné :

- éliminer ou réduire le plus possible les risques (conception et construction sûres de façon inhérente), tout en prenant en compte la technologie et les pratiques existantes au moment de la conception, ainsi que les considérations techniques et économiques compatibles avec un niveau élevé de protection de la santé et de la sécurité ;

- le cas échéant, prendre des mesures de protections appropriées, y compris des alertes, si nécessaire, concernant les risques qui ne peuvent pas être éliminés ;

- informer les utilisateurs des risques résiduels dus à toute défaillance des mesures de protection adoptées.

Le principe de la gestion des risques s'applique dès la conception initiale du dispositif médical. L'Annexe C de cette norme dresse une liste de questions pouvant être utilisées pour identifier les caractéristiques des dispositifs médicaux ayant une influence potentielle sur la sécurité.

L'Annexe I de cette norme donne des indications sur l'application de l'analyse de risque, en matière de phénomènes biologiques dangereux. Il peut s'agir, d'une part, d'effets à court terme, comme une cytotoxicité, une irritation de la peau, des yeux et des muqueuses, une toxicité systémique aiguë ou une hémolyse et, d'autre part, les phénomènes peuvent être des effets à long terme, comme une sensibilisation, la génotoxicité, des effets toxiques subaigus/subchroniques et chroniques, la cancérogénicité (tumorigénicité) ou encore des effets sur la reproduction, y compris la tératogénicité. L'estimation des risques biologiques doit prendre en compte les éléments suivants :

- les caractéristiques physiques et chimiques des différents choix de matériaux,
- tout antécédent d'utilisation clinique ou des informations sur une exposition humaine,
- toute toxicité existante et d'autres informations relatives à la sécurité biologique, concernant les matériaux utilisés dans le produit et ses composants,
- des modes opératoires d'essai dans les normes de la série NF EN ISO 10993, la partie 1 donnant le cadre.

III.A.3. Normes NF EN ISO 10993 (Evaluation biologique)

Les normes de la série NF EN ISO 10993, regroupées sous le titre général d'« Evaluation biologique des dispositifs médicaux », sont au nombre de 20 à ce jour (cf. Figure 2)²⁴³⁻²⁴⁴, certaines sont en cours de révision. La première partie, la NF EN ISO 10993-1 intitulée « Evaluation et essais au sein d'un processus de gestion du risque », fixe les principes généraux relatifs à l'évaluation des risques biologiques des matériaux et des dispositifs médicaux.^{244r} L'utilisation des essais tels que décrits dans la série des NF EN ISO 10993 apporte une validité scientifique au processus d'évaluation de la réponse biologique et offre une plus grande assurance au public concernant la sécurité biologique des dispositifs médicaux, tout en prenant les dispositions nécessaires pour l'utilisation éthique des animaux.

La norme NF EN ISO 10993-1 détaille concrètement le processus d'évaluation des risques biologiques d'un dispositif médical. Elle détermine les essais à mettre en oeuvre pour évaluer la réponse biologique en fonction d'une classification des dispositifs suivant la nature et la durée du contact avec le corps humain.

L'annexe A de la norme NF EN ISO 10993-1 fournit un tableau récapitulatif des différents risques biologiques à prendre en considération selon cette classification. Les effets biologiques principaux à considérer sont : la cytotoxicité, la sensibilisation, l'irritation ou réaction intradermique, la toxicité systémique (aiguë, subaiguë/subchronique), la génotoxicité, l'implantation (toxicité locale) et l'hémocompatibilité. Ce tableau n'est pas une liste exhaustive de contrôle d'essais à effectuer, mais donne un cadre pour guider la réflexion dans l'élaboration du programme d'évaluation des risques biologiques le plus adapté au dispositif médical, en tenant compte de la nature et de la durée d'exposition. Dans cet esprit, selon le cas, il conviendra d'évaluer des risques biologiques complémentaires tels que : toxicité chronique, cancérogénicité, biodégradation, toxicocinétique, immunotoxicité, toxicité pour la reproduction/le développement ou toute autre toxicité particulière (ex. : neurotoxicité). Ainsi, le programme d'évaluation des risques biologiques devra être mûrement réfléchi et justifié selon le dispositif médical et son application spécifique.

Partie 1	Evaluation et essais au sein d'un processus de gestion du risque
Partie 2	Exigences relatives à la protection des animaux
Partie 3	Essais concernant la génotoxicité, la cancérogénicité et la toxicité sur la reproduction
Partie 4	Choix des essais concernant les interactions avec le sang
Partie 5	Essais concernant la toxicité <i>in vitro</i>
Partie 6	Essais concernant les effets locaux après implantation
Partie 7	Résidus de stérilisation à l'oxyde d'éthylène
Partie 8	Sélection et qualification des matériaux de référence utilisés pour les essais biologiques
Partie 9	Cadre pour l'identification et la quantification de produits potentiels de dégradation
Partie 10	Essais d'irritation et d'hypersensibilité retardée
Partie 11	Essais de toxicité systémique
Partie 12	Préparation des échantillons et matériaux de référence
Partie 13	Identification et quantification de produits de dégradation de dispositifs médicaux à base de polymères
Partie 14	Identification et quantification des produits de dégradation des céramiques
Partie 15	Identification et quantification des produits de dégradation issus des métaux et alliages revêtus et non revêtus
Partie 16	Conception des études toxicocinétiques des produits de dégradation et des substances relargables
Partie 17	Etablissement des limites admissibles des substances relargables
Partie 18	Caractérisation chimique des matériaux

Partie 19	Caractérisations physico-chimique, morphologique et topographique des matériaux (<i>spécification technique, en anglais</i>)
Partie 20	Principes et méthodes relatifs aux essais d'immunotoxicologie des dispositifs médicaux (<i>spécification technique, en anglais</i>)

Figure 2. Liste des parties composant la série des normes NF EN ISO 10993

III.B. Précautions pour le cas des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux

A partir des éléments développés sur les nanomatériaux de manière générale dans la partie II. du rapport, cette partie s'attache à extraire ceux à prendre particulièrement en compte pour l'évaluation spécifique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux.

Il paraît aussi important de rappeler que tout essai *in vivo* ou *in vitro* doit être fondé sur des Bonnes Pratiques de Laboratoires.

III.B.1. Caractérisation physico-chimique et reproductibilité des lots de nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux

Avant toute évaluation biologique pour vérifier la biocompatibilité d'un dispositif médical contenant des nanomatériaux, il est impératif de caractériser systématiquement et précisément le nanomatériau utilisé, afin de définir au mieux le potentiel toxique du nanomatériau, dans les milieux biologiques concernés et de s'assurer de la reproductibilité des résultats obtenus. La caractérisation de ces états est fortement recommandée avant l'évaluation des risques biologiques du nanomatériau et les tests toxicologiques devront être réalisés sur le nanomatériau dans l'état le plus représentatif de la situation clinique.

La norme NF EN ISO 10993-1 précise bien dans l'Article 6. sur le processus d'évaluation des risques biologiques que la caractérisation des matériaux est une étape préliminaire essentielle du processus d'évaluation des risques biologiques.^{244r} Comme nous avons vu dans la partie II.C. de ce rapport, ceci est d'autant plus vrai pour les nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux. Une caractérisation précise est nécessaire pour deux raisons :

- 1) mieux interpréter les résultats des essais biologiques ;
- 2) mieux appréhender les risques en cas d'une quelconque modification du matériau (changement de fournisseur, modification dans le « procédé » de fabrication...) et assurer au mieux la reproductivité des lots soumis à essais afin de garantir la cohérence des résultats.

Pour le moment, la caractérisation physico-chimique des matériaux décrite dans les normes NF EN ISO-18 et 19^{244c, 244q} est adaptée en fonction de la substance chimique sous forme macroscopique. Or, pour les nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux, de multiples paramètres physico-chimiques influencent leur potentiel toxique. C'est pourquoi, il est nécessaire de s'adapter à ce cas particulier. Comme développé dans la partie II.C. de ce rapport, les huit paramètres physico-chimiques nécessaires à la bonne caractérisation des nanomatériaux, avant toute évaluation biologique sont :

- Taille et distribution de taille
- Morphologie
- Etat d'agrégation / d'agglomération
- Solubilité et état de dispersion
- Surface spécifique
- Composition (la composition chimique et la structure cristallographique entre autres)
- Charge de surface
- Chimie de surface

Les paramètres présentés ne constituent pas une liste de contrôle exhaustive, c'est au fabricant de réfléchir sur les caractérisations les plus adéquates à l'évaluation des risques biologiques de son dispositif médical contenant des nanomatériaux, devant même les compléter si nécessaire. On notera d'ailleurs la difficulté de caractériser certains paramètres (ex. la taille ou l'état d'agrégation/d'agglomération) qui changent selon les conditions opératoires (sous vide ou en solution par exemple), le milieu expérimental (polaire/apolaire, aqueux pur/milieu biologique...), au cours du temps et du cycle de vie du dispositif.

Avant toute évaluation des risques biologiques, il est naturellement primordial de connaître avec précision la composition des matériaux utilisés dans le dispositif médical étudié, comme stipulé dans la réglementation. On accordera une attention particulière à la description des impuretés dans la composition chimique, car elles peuvent être en quantité importante et avoir des impacts conséquents sur la toxicité globale du dispositif médical, comme cela a pu être montré pour les nanotubes de carbone. Concernant les impuretés pyrogènes, l'annexe F de la NF EN ISO 10993-11 introduit les différents types d'essais pouvant être menés pour détecter de telles substances (test pyrogène lapin, LAL, ...).^{244j} Tester *in vivo* fait partie intégrante de l'évaluation des risques biologiques de tout dispositif médical implantable, en contact direct ou indirect avec le sang, destiné à la sphère nasale et gynécologique ou dont le process de fabrication fait intervenir de l'eau. Il est à plus forte raison recommandé pour les dispositifs contenant des nanomatériaux qui ont tendance à adsorber facilement les impuretés.

Nous insistons de nouveau sur le fait que les paramètres présentés ne constituent pas une liste de contrôle exhaustive, mais sont des paramètres recommandés pour caractériser correctement un nanomatériau utilisé dans un dispositif médical. C'est au fabricant de juger de l'adéquation des caractérisations nécessaires pour l'évaluation des risques biologiques de son dispositif médical contenant des nanomatériaux et de le justifier. Pour chaque paramètre mesuré, il conviendra de préciser la méthode utilisée et l'incertitude de mesure. On s'assurera que les mesures soient effectuées sur un nombre suffisant d'échantillons.

Les informations de caractérisation données par le fournisseur de matière première sont certes utiles, mais ne dispensent pas le fabricant de s'assurer de la véracité de ces données sur le nanomatériau intégré dans le dispositif médical final. En effet, les paramètres caractéristiques du nanomatériau peuvent évoluer au cours du temps, notamment lors du processus de fabrication.

Enfin, une bonne caractérisation permet aussi de vérifier la conformité et la reproductibilité des lots entre eux. Il est primordial que la production soit contrôlée et reproductible pour assurer que les nanomatériaux incorporés dans le dispositif médical sont rigoureusement identiques entre eux. C'est la seule garantie que l'évaluation des risques biologiques effectuée sur le dispositif médical contenant des nanomatériaux soit valable pour tous les lots produits.

C'est pourquoi le fabricant de dispositif médical contenant des nanomatériaux doit s'assurer que les caractérisations des nanomatériaux reçus de ses fournisseurs sont valides, qu'elles sont reproductibles entre les lots et que les échantillons utilisés pour l'évaluation des risques biologiques sont rigoureusement identiques aux lots produits.

III.B.2. Préparation des échantillons et questions d'unité

Selon la réglementation en vigueur, l'évaluation des risques biologiques est effectuée sur le produit fini. En effet, il est possible que l'association de deux matériaux non toxiques puisse engendrer un produit avec des effets toxiques. Cet « effet cocktail » a été observé lors de l'association des fullerènes avec l'acide gallique par Salonen *et al.*, provoquant la contraction des membranes cellulaires.²⁴⁵

La préparation des échantillons et des matériaux de référence est la première étape dans l'évaluation des risques biologiques du dispositif médical. Elle est détaillée dans la norme NF EN ISO 10993-12.^{244k} On qualifiera d'échantillons soumis à l'essai, des échantillons mis au contact des systèmes réactifs (ex. : milieu biologique) pouvant être le dispositif médical lui-même, un échantillon représentatif ou un (des) extrait(s) du dispositif médical.

• Préparation des échantillons à tester

D'après la norme NF EN ISO 10993-12,^{244k} les essais biologiques peuvent être réalisés en contact direct avec le dispositif médical ou à l'aide d'extraits. Cependant, la méthode de préparation des échantillons à tester devra être adaptée aux particularités de la structure nanométrique.

Lorsque les nanomatériaux sont solidement ancrés dans une matrice macroscopique intégrée dans le dispositif médical, il n'y a pas *a priori* de difficultés à appliquer les protocoles en vigueur pour la préparation des échantillons, que ce soit en contact direct ou avec des extraits. Cependant, il n'en demeure pas moins qu'il faudra prendre en compte la grande réactivité potentielle de la surface des échantillons représentatifs des nanomatériaux.

En revanche, la préparation devient plus délicate pour les nanomatériaux libres ou faiblement agrégés, mais aussi pour les dispositifs médicaux libérant des nano-objets au cours de l'extraction. Dès lors, il faudra adapter les protocoles selon le cas et en tenir compte dans l'interprétation rationnelle des résultats. Notamment, il faudra s'assurer du comportement de ces nanomatériaux libres dans les différents véhicules d'extraction proposés par la norme NF EN ISO 10993-12. La solubilité et la formation d'agrégats/d'agglomérats sont en particulier des facteurs qui peuvent modifier la réponse biologique.

• **L'importance de la dispersion dans les échantillons soumis à l'essai**

De manière générale, les méthodes d'évaluation des risques biologiques validées ont été développées pour des substances chimiques solubles. Or, les nanomatériaux libres ont tendance à former des agrégats et agglomérats. C'est pourquoi, de nombreux chercheurs tentent d'obtenir des suspensions finement dispersées des nanomatériaux étudiés. Il est possible de réduire quelque peu cette forte tendance à s'agréger et à s'agglomérer, avec des méthodes physiques comme la sonication, ou en ajoutant des surfactants ou agents dispersifs. Or, si ces méthodes permettent une meilleure dispersion et dans certains cas une meilleure stabilité des nanomatériaux libres, elles peuvent également fausser l'évaluation des risques biologiques, car ces conditions ne sont peut-être plus représentatives de la réalité clinique. De plus, certains surfactants pourraient être aussi biologiquement actifs et fausser les résultats biologiques.

On peut remarquer que les milieux de culture utilisés pour réaliser les tests contiennent des protéines qui peuvent agir comme des agents dispersifs « naturels ». Par exemple, les milieux de culture complétés en sérum contiennent notamment de l'albumine. Or, l'albumine étant un zwitterion (élément chargé à la fois positivement et négativement), est un bon agent dispersif. Des auteurs argumenteraient que la part d'inconnues inhérentes à l'expérimentation *in vivo* pourrait être attribuée au sérum dont on ne maîtrise pas forcément la composition exacte. C'est entre autres une des explications pour justifier le peu de corrélations entre les résultats *in vitro* et ceux *in vivo* pour les nanomatériaux.²⁴⁶ Ainsi, des précautions doivent être prises lorsqu'on veut extrapoler les résultats *in vitro* aux situations *in vivo*.^{55k, 87} Comme nous avons vu précédemment, les protéines plasmatiques s'adsorbent très rapidement sur les nano-objets et influencent leur devenir biologique. D'après une étude *in vitro* de Barret *et al.*, l'ajout du sérum a pour conséquence de réduire la cytotoxicité des nanoparticules de silice.²⁴⁷

De manière générale, il conviendra d'effectuer l'évaluation des risques biologiques dans les conditions expérimentales reflétant le mieux les conditions cliniques, notamment en termes d'agrégation/agglomération. Quelle que soit la méthode utilisée pour la préparation des échantillons, un équilibre devra être choisi entre la nécessité de dispersion et de stabilité, sans négliger l'influence que cela aura sur les mesures de toxicité et la qualité des protocoles expérimentaux.

● **Echantillons de référence**

Un matériau de référence certifié est un matériau accompagné d'un certificat, dont une (ou plusieurs) valeur(s) de la (des) propriété(s) est (sont) certifiée(s). Une procédure établit son raccordement à la réalisation exacte de l'unité dans laquelle les valeurs de propriété sont exprimées, et pour laquelle chaque valeur certifiée est accompagnée d'une incertitude. L'utilisation des matériaux de référence permet ainsi d'établir qualitativement et quantitativement la réponse biologique du matériau soumis à des conditions d'essai spécifiées. Or, dans le cas des nanomatériaux, la production de matériaux de référence n'en est encore qu'à ses balbutiements. Peu de nanomatériaux de référence existent actuellement, le principal obstacle étant l'absence de protocoles standardisés et de paramètres physico-chimiques clairement définis. Les instituts nationaux de métrologie sont souvent dans l'incapacité de mettre en place des inter-comparaisons fiables afin d'échanger ou comparer des données de mesure. Dans le domaine de la nanométrie dimensionnelle, des chaînes d'étalonnage commencent à se mettre en place au niveau national et européen. Toutefois, les données émanant des différents laboratoires engagés dans les études de nanotoxicologie ne pourront être comparables que lorsque les chaînes de traçabilité seront établies.

Ainsi, pour le moment, des nanomatériaux témoins positifs et négatifs attendent d'être définis. Il existe un réel besoin de collecter les données sur les nanomatériaux suffisamment bien caractérisés afin de servir de matériel étalon pour comparaison. Par conséquent, il est d'autant plus nécessaire de bien caractériser les échantillons soumis aux essais.

● **Unités des échantillons soumis à l'essai**

La notion d'unité des échantillons soumis à l'essai est cruciale pour l'évaluation des risques biologiques, car il faut déterminer ce que l'on va étudier exactement. Or de plus en plus de personnes s'interrogent sur l'adéquation et la pertinence de l'unité de masse dans le cas des nanomatériaux. En étudiant chez les rats la réponse inflammatoire induite par l'instillation de nanoparticules monodispersées de TiO_2 de tailles différentes, Oberdörster *et al.* s'attendaient à une réponse dose-dépendante en fonction de la masse totale instillée pour chaque type de nanoparticule. Or pour une même masse donnée, les nanoparticules de 25 nm déclenchaient une réponse bien plus forte que les nanoparticules de 250 nm.²⁴⁸ En regroupant les résultats, les auteurs ont remarqué qu'en traçant la réponse inflammatoire en fonction de la surface spécifique, on obtenait une seule courbe réponse dose-dépendante. Ces résultats soutiennent le concept que la surface spécifique est une unité tout à fait pertinente pour évaluer la toxicité des nanomatériaux et que la réponse biologique peut être différente selon la taille de la surface considérée (dimension nano ou micrométrique).^{1, 3} D'autres auteurs proposent plutôt comme unité de base le nombre de particules pour évaluer *in vivo* la réponse

inflammatoire pulmonaire.²⁴⁹ On peut également prendre en compte la porosité pour les matériaux nanoporeux.

Les mêmes conclusions ont été tirées à partir de tests *in vitro* réalisés avec d'autres nanomatériaux. Teegarden *et al.* ont également remarqué que la réponse exprimée en unité de masse ne rendait pas bien compte des effets induits par les nanomatériaux, mais qu'elle était mieux corrélée lorsque la dose avait été ajustée en fonction de la surface spécifique ou du nombre de particules.²⁵⁰ Lison *et al.* sont arrivés à cette même conclusion en étudiant les nanoparticules de silice *in vitro*.²⁵¹ Ils ont montré que le degré de cytotoxicité et l'internalisation cellulaire étaient proportionnels à une unité nominale comprenant la surface spécifique, la masse et le nombre. En effet, l'internalisation des nanomatériaux par les cellules dépendent fortement de la taille et de la surface spécifique. De plus, il est avantageux de raisonner en surface spécifique puisque cette donnée est indépendante de l'état d'agglomération (mais pas de l'agrégation).

Par conséquent, dans les essais biologiques, la masse qui est l'unité classiquement utilisée pour calculer les gammes de concentration n'est peut-être plus une référence pertinente ou suffisante dans le cas des nanomatériaux. Si l'évaluation des risques biologiques semble mieux rendre compte de la réalité lorsque les échantillons soumis à l'essai sont préparés en fonction de la surface spécifique ou du nombre de particules, alors ces modifications sont recevables et doivent être documentées dans l'analyse de risque. De même, il pourrait s'avérer judicieux d'effectuer les extractions en fonction non pas de la masse, mais de la surface spécifique.

III.B.3. Toxicocinétique et étude de biodégradation

Il est spécifié dans l'annexe A de la norme NF EN ISO 10993-16^{244o} que les études toxicocinétiques sont recommandées :

- si le dispositif est conçu pour être résorbable ;
- si le dispositif est un implant à contact permanent et si une biodégradation ou une corrosion significative est connue ou probable et/ou s'il se produit une migration des substances relargables du dispositif ;
- s'il est probable ou certain que des quantités importantes de produits de dégradation ou de substances relargables, présentant un potentiel toxique ou réactif, sont libérées dans le corps pour un dispositif médical lors de son usage clinique.

Il est important de déterminer la nature des produits de dégradation de tout dispositif médical, surtout si ces produits sont à l'échelle nanométrique. Le mécanisme et la cinétique de leur élimination devront être étudiés, puisque certains effets toxiques peuvent y être liés.

Elaborée pour les produits de dégradation et les extractibles des dispositifs médicaux en général, l'évaluation de la toxicocinétique telle que décrite dans la norme NF EN ISO 10993-16 est valable pour les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux libres ou susceptibles d'être

libérés. C'est un préalable requis pour tout programme d'évaluation de la sécurité du dispositif dans le cas des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux ou susceptibles d'en relarguer.

Nous avons vu qu'il y a un risque de toxicité et de migration des nanomatériaux libres, bien que ce risque ne soit que très partiellement connu. Au vu des recommandations de la norme, il convient d'envisager des études toxico-cinétiques pour les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux, s'ils sont en contact direct avec le corps humain, notamment s'ils sont implantables. Ces études sont d'autant plus nécessaires pour des dispositifs médicaux constitués de nanomatériaux libres ou pour les dispositifs médicaux dont les produits de dégradation sont des nano-objets. Ce dernier cas couvre notamment les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux incorporés dans une matrice macroscopique solide (mais qui risquent de se détacher de cette matrice dans le milieu biologique). Le plan de gestion de risque devra examiner cette possibilité, notamment en cas de fonctionnement défectueux du dispositif. L'évaluation toxico-cinétique permet d'identifier les organes touchés et l'état des nanomatériaux au cours de leur cycle de vie (solubilité, agrégation, produits de dégradation, etc.) et donc mieux caractériser leur toxicité. Il ne faudra pas non plus oublier de caractériser les produits de dégradation issus des nanomatériaux et les impuretés issues de la fabrication des dispositifs.

Les propriétés des nanomatériaux peuvent être différentes de celles des matériaux conventionnels, mais s'étudient néanmoins de manière similaire. L'évaluation de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'élimination (ADME) des nanomatériaux libres (comprenant aussi les produits de dégradation nanométriques) et de leurs produits de dégradation ou de solubilisation dépendent de 4 facteurs : la voie d'administration, l'espèce animale, la taille et l'état de la surface du nanomatériau.²⁵² L'étude de la biodistribution devra être effectuée par des méthodes pertinentes (ex. : marquage fluorescent ou radioactif). Il faudra tout d'abord s'assurer que le marqueur choisi n'est pas susceptible de modifier les propriétés physico-chimiques ou biologiques des nanomatériaux libres et donc leur biodistribution. Il convient de vérifier également que le marqueur reste solidement attaché aux nanomatériaux libres tout le long de l'étude, afin d'éviter les confusions entre le suivi du marqueur libéré et celui des nanomatériaux libres.

Les techniques d'imagerie scintigraphiques, de TEP (tomographie par émission de positon) ou d'imagerie en fluorescence ne donnent pas de résultats quantitatifs mais sont adaptées à l'étude qualitative de la biodistribution des nanomatériaux libres (DM invasifs, DM d'abord ORL, pulmonaire et digestif). Ces techniques sont aussi valables pour déterminer des sites de séquestration et des phénomènes de migration.

Il est donc fortement recommandé de mener à bien des études de toxico-cinétiques sur les nanomatériaux libres et les produits de dégradation nanométriques, selon une réflexion scientifique adaptée au cas étudié, comme stipulé dans la norme NF EN ISO 10993-16. La méthodologie pourra s'inspirer des études ADME conduites sur les médicaments.²⁵²⁻²⁵³ Cette évaluation toxico-cinétique permettra de mieux caractériser le risque pour orienter les études de toxicité ultérieures et d'ajuster davantage le plan de gestion de risque au dispositif médical étudié.

III.B.4. Tests de cytotoxicité

La norme NF EN ISO 10993-5 traite des essais *in vitro*, pour déterminer le potentiel cytotoxique des dispositifs médicaux, des matériaux qui les composent et/ou de leurs extraits.^{244s}

L'objectif est d'évaluer :

- la lyse cellulaire,
- l'inhibition de la croissance cellulaire,
- la formation de colonies,
- les autres effets sur les cellules (ex. : morphologie, lésions membranaires, dysfonctionnements métaboliques, réponse inflammatoire...).

Notamment les protocoles pour certaines méthodes standardisées et validées comme le « rouge neutre », la « formation de colonies », le « MTT » et le « XTT » y sont détaillés.

• **Perturbation des tests de cytotoxicité par les nanomatériaux**

Récemment, la fiabilité de certaines méthodologies a été remise en cause dans le cas des nanomatériaux. En effet, l'absorbance photométrique et la fluorescence intrinsèque de certains nanomatériaux pourraient modifier les résultats colorimétriques et fluorométriques. Il semblerait que la surface très réactive des nanomatériaux entraînerait la fixation d'analytes ou d'agents colorants, introduisant des artéfacts et rendant les mesures spectrométriques ambiguës ou incohérentes.

Par exemple, il a été montré que les nanomatériaux à base de carbone pouvaient absorber les molécules du colorant rouge neutre et donner des faux positifs.²⁵⁴ L'étude de Monteiro-Riviere *et al.* a également souligné la difficulté d'interprétation d'une numération cellulaire après marquage au bleu trypan (autre méthode d'évaluation de la cytotoxicité), les agrégats/agglomérats de nanoparticules pouvant recouvrir les cellules et compliquer ainsi les analyses.

Le test de cytotoxicité au MTT a aussi fait l'objet de questionnements, car des discordances ont été observées entre les résultats obtenus par cette méthode et ceux obtenus par d'autres techniques. Ainsi les résultats d'un test MTT, réalisé sur des cellules traitées par des nanotubes de carbone monofeuillets, indiquent une diminution dose-dépendante du nombre de cellules vivantes.¹⁰⁸ En revanche, aucune cytotoxicité notable n'a été détectée par le test WST, résultat corroboré par un test LDH et un marquage des cellules à l'iodure de propidium/annexine V suivi d'une analyse en cytométrie de flux. Pour expliquer cette différence, Worle-Kirsch *et al.* ont émis l'hypothèse que les nanotubes de carbone interagissaient avec les cristaux MTT-formazan, mais pas avec les réactifs du WST, XTT ou INT.¹⁰⁸ La liaison du nanotube de carbone avec le réactif soluble du MTT perturberait la réaction colorimétrique, qui reflète la viabilité cellulaire. Pour s'affranchir des problèmes causés par les réactifs, certains auteurs proposent d'utiliser l'essai par formation de colonies.¹⁸⁵ Il semble qu'il soit également possible d'utiliser le test iodure de propidium.

Au vu des erreurs de lecture pouvant être induites par les nanomatériaux, une attention particulière devra être apportée à la reproductibilité, fiabilité et sensibilité des essais de cytotoxicité choisis, avant toute interprétation hâtive. Notamment, des précautions devront être prises concernant d'éventuelles interférences des nanomatériaux avec les tests utilisant des agents colorimétriques et fluorescents. Si tel est le cas, la corroboration de plusieurs résultats provenant de différentes méthodologies pourrait s'avérer nécessaire, afin de proposer une interprétation scientifiquement pertinente.

III.B.5. Tests de génotoxicité

Les tests de génotoxicité cités dans la norme NF EN ISO 10993-3 font partie intégrante de tout programme d'évaluation des risques biologiques d'un dispositif médical invasif et/ou en contact prolongé/permanent, ce programme étant plus ou moins complet selon le contexte de l'évaluation et la composition du dispositif.^{244f} Actuellement, il existe diverses méthodes pour évaluer différents risques de génotoxicité des dispositifs.

• Tests de génotoxicité *in vitro*

La norme NF EN ISO 10993-3 préconise une série d'essais de génotoxicité *in vitro*. Cette série doit comporter soit :

- soit trois essais *in vitro* différents (1. un essai de mutation réverse sur des bactéries (test d'Ames), 2. un essai de mutation génique sur des cellules de mammifères et 3. un essai d'aberration chromosomique sur des cellules de mammifères) ;
- soit deux essais différents, l'essai 1 et un essai sur le lymphome de souris, car les essais 2. et 3. peuvent être remplacés par un essai sur le lymphome de souris intégrant la détermination du nombre et de la taille des colonies afin de couvrir les critères de clastogénicité et de mutations géniques).

Le test de mutation reverse sur bactéries (test d'Ames selon la ligne directrice 471 de l'OCDE),²⁵⁵ qui mesure l'augmentation de la fréquence des mutations ponctuelles apr les produits induisant des mutations géniques, peut donner des résultats faussement-négatifs avec les nanomatériaux.¹⁴⁹⁻¹⁵⁰ En effet, il semblerait que les nanomatériaux diffusent difficilement à travers la membrane bactérienne et les procaryotes n'ont pas la capacité d'internaliser les substances étrangères par endocytose. De plus, certains mécanismes d'action génotoxique proviennent de l'interaction des nanomatériaux avec les mitochondries, mécanisme qui ne peut être détecté par le test sur les bactéries. Par conséquent, ce test risque de produire de nombreux résultats faussement négatifs. Il pourrait alors s'avérer nécessaire de le remplacer par un autre test *in vitro*.

Il existe d'autres essais *in vitro* qui peuvent être recommandés : le test des comètes et le test des micronoyaux *in vitro*.

Le test des comètes mesure les lésions non réparées des brins d'ADN et les sites alcalilabiles de l'ADN. Or, comme le test des comètes compte dans ses résultats positifs les lésions réparables, mais non encore réparées, les résultats obtenus par cette méthode donnent des niveaux de dommages génétiques plus importants que les tests de clastogénèse. Il est donc moins fiable que le test du micronoyau dans l'évaluation génotoxique, mais reste adapté aux nanomatériaux pour révéler les lésions primaires de l'ADN. Dans ce cas, une partie importante des effets génotoxiques des nanoparticules étant susceptible d'être en rapport avec la production de formes activées de l'oxygène, il apparaît nécessaire de compléter le protocole traditionnel en utilisant des enzymes permettant de mettre en évidence les lésions oxydatives de l'ADN comme par exemple en traitant les cellules par la protéine fpg ou la protéine hOGG1.

Le test des micronoyaux quantifie les effets clastogènes ou aneugènes résultant des dommages sur les chromosomes (fragmentation ou perte de chromosomes entiers) ou de l'interférence avec les mécanismes de la mitose (perte de chromosomes) ; il mesure les lésions qui demeurent après division cellulaire, c'est à dire uniquement celles qui n'ont pas été réparées.

Le test des micronoyaux *in vitro* est *a priori* également adapté pour les nanomatériaux. Les cellules à privilégier sont les cellules humaines en culture primaire, comme les lymphocytes. Si le protocole choisi prévoit d'utiliser la cytochalasine B pour identifier les cellules en division, on s'assurera au préalable que ce composé ne perturbera pas l'endocytose et/ou l'exocytose des nanomatériaux, comme il a pu être montré pour les nanoparticules de fer ultra-superparamagnétiques.²⁵⁶

Quelques soient les essais *in vitro* choisis, en cas d'utilisation d'une lignée primaire ou d'une lignée continue de cellules de mammifères, un certain nombre d'informations concernant l'expression phénotypique de celle-ci doit être documenté, en particulier son statut p53 et sa capacité à prendre en charge les formes réactives de l'oxygène (SOD, GSH/GSR, GST, GPX...). Par ailleurs les flux intra et extracellulaires des structures nanoparticulaires étant fonction de la capacité d'endocytose et d'exocytose de la cellule, ces capacités doivent être documentées pour toutes les lignées cellulaires mises en œuvre. Les systèmes cellulaires déficients ne doivent pas être retenus.

Par ailleurs, il est souvent nécessaire que se produise l'internalisation de ces nanomatériaux dans les cellules pour observer un effet toxique.¹⁴⁹ La vitesse d'internalisation est très variable, dépendant de la nature du processus et du nanomatériau. S'il faut parfois attendre plusieurs cycles

cellulaires, récemment, Dombu et *al.* ont montré que des nanoparticules de nature polysaccharidique pénètrent dans les cellules épithéliales bronchiques humaines en 3 minutes et atteignent un équilibre au bout de 40 minutes.²⁵⁷ Les protocoles devront donc être adaptés aux cinétiques d'endo et d'exocytose des nano-objets dans le type cellulaire retenu.

• **Tests de génotoxicité *in vivo***

Tout essai *in vivo* doit être choisi sur la base du critère le plus approprié identifié par les essais *in vitro*. Une tentative doit être faite pour démontrer que la substance d'essai a atteint l'organe cible. Si cela ne peut pas être démontré, un second essai *in vivo* dans un autre organe cible peut être requis pour vérifier l'absence de génotoxicité *in vivo*.

Les essais *in vivo* couramment utilisés sont le test de micronoyaux sur les érythrocytes de rongeurs, l'analyse de métaphases dans la moelle osseuse de rongeur ou l'essai de synthèse non programmée de l'ADN sur des hépatocytes de mammifères. Le choix du système d'essai le plus approprié doit être justifié et documenté. Si d'autres systèmes d'essai *in vivo* pour étudier la génotoxicité sont utilisés afin d'obtenir des informations supplémentaires, la justification de cette décision doit être démontrée et documentée.

Les tests *in vivo* devront utiliser des voies et des conditions d'exposition reflétant au mieux les conditions cliniques en termes de niveaux d'exposition, de rythmes d'administration et de cytotoxicité, mais également de niveau d'induction de phénomènes inflammatoires. En particulier, le recrutement de cellules impliquées dans l'inflammation, telles que les macrophages et les polynucléaires neutrophiles qui peuvent par la production de formes radicalaires ou par interférence avec les mécanismes de réparation, avoir leurs effets propres devra être rigoureusement pris en compte.

• **Recommandations sur les tests de génotoxicité**

Comme pour tout type de dispositif médical, afin d'évaluer la génotoxicité, il est recommandé de réaliser plusieurs tests, à savoir au moins deux tests *in vitro* différents et un test *in vivo*.

D'une manière générale, s'il s'avère que si le dispositif est génotoxique, il n'est pas souhaitable de poursuivre son développement et donc la question d'une évaluation de la cancérogénicité ne se pose pas. Le profil toxicologique doit toujours être confronté aux bénéfices attendus de l'utilisation de nanomatériaux, afin de pouvoir justifier de leur utilisation.

III.B.6. Immunotoxicologie, hypersensibilité retardée et irritation

La norme NF EN ISO 10993-10²⁴⁴ⁱ traite des essais d'irritation et d'hypersensibilité retardée et la norme ISO/TS 10993-20^{244d} détaille les principes et méthodes relatives aux essais d'immunotoxicologie des dispositifs médicaux.

Les cellules impliquées dans la réponse immunitaire comme les cellules dendritiques ou les macrophages participent au transport et à l'élimination des nanomatériaux ; afin de mieux comprendre l'impact potentiel de ces derniers, les analyses d'immunotoxicité devront donc tenir compte de ces interactions cellulaires. En conséquence, le développement de modèles cellulaires pour l'étude de l'effet des nanomatériaux sur ces cellules en particulier et sur le système immunitaire en général doit être documenté et justifié. Les tests de sensibilisation sont faits en général par voie topique.

Il a été constaté que le test de sensibilisation Buehler n'est pas très sensible et donc probablement peu adapté aux nanomatériaux d'où une faible utilisation de ce test.

En revanche, le test dermique LLNA (*Local Lymph Node Assay* ou essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques) est souvent utilisé pour les nanomatériaux, par exemple pour évaluer les nanoparticules de TiO₂ dans les produits cosmétiques en application topique. Toutefois, il a été constaté que la différenciation des substances irritantes et allergènes peut poser problème dans le cadre du LLNA, des faux-positifs pouvant également être observés.²⁴⁴ⁱ De plus, les nanomatériaux sont capables d'avoir un effet adjuvant¹¹⁶⁻¹¹⁷ ou immunosuppresseur sur les réactions de sensibilisation provoquées par d'autres substances, les exacerbant ou les modifiant.

Le test de Magnusson et Kligman qui comporte une injection intradermique préalable, est réputé être plus sensible,²⁴⁴ⁱ la barrière dermique n'étant pas à franchir. Or, la possibilité qu'un nanomatériau déclenche une réaction d'hypersensibilité retardée et d'immunotoxicité après exposition sur la peau dépend de sa capacité à traverser la couche épidermique et d'interagir avec les protéines de l'organisme. Ces interactions sont cruciales pour l'étude de la sensibilisation, car c'est le complexe protéine-nanomatériau qui est souvent reconnu par le système immunitaire et qui oriente l'effet biologique.

Pour les tests d'irritation, il semble que les référentiels actuels restent applicables. Cependant, concernant l'irritation cutanée, les protocoles avec administration intradermique étant conçus pour des solutions homogènes, il faudra rester vigilant lors de l'interprétation des expériences menées avec des suspensions contenant des nanomatériaux non solubilisés. En effet, ceux-ci pourraient engendrer des réponses positives artéfactuelles liées non pas aux caractéristiques intrinsèques ou chimiques du nanomatériau mais uniquement à sa présence physique dans le derme.

Il a également été montré que la présence de nanoparticules (notamment le noir de carbone et le dioxyde de titane) induisait des artefacts dans la mesure *in vitro* du relargage de cytokines pro-inflammatoires.²⁵⁸ Ce phénomène, lié à l'adsorption de cytokines sur les nanoparticules, nécessite donc une évaluation multiparamétrique.

III.B.7. Tests d'hémocompatibilité

L'évaluation de l'hémocompatibilité (NF EN ISO 10993-4^{244g}) aborde 5 paramètres : hématologie, thrombose, coagulation, plaquettes et système du complément. Ce sont précisément ces points qu'il faudra rechercher dans la détermination de l'hémocompatibilité des nanomatériaux. En effet, des études ont montré que des nanomatériaux ont migré dans la circulation sanguine en raison de leur dimension nanométrique. Or, certains ont un potentiel pro-thrombotique et sont capables d'activer les plaquettes. L'évaluation de l'hémocompatibilité devra donc être effectuée notamment pour les dispositifs médicaux implantables contenant des nanomatériaux, en contact direct ou indirect avec le sang, et/ou s'il existe une possibilité de migration de particules nanométriques libres dans la circulation sanguine. Il existe aussi une norme ASTM américaine spécifique pour l'évaluation de l'hémocompatibilité *in vitro* des nanoparticules : l'ASTM E2524 - 08 *Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles*.²⁵⁹

III.B.8. Tests de toxicité systémique (aiguë, subaiguë/subchronique et chronique)

La norme NF EN ISO 10993-11^{244j} pose le cadre des études de toxicité systémique aiguë, subaiguë/subchronique et chronique et offre un grand panel de voies d'exposition exploitables pour évaluer les effets à distance sur l'organisme, à plus ou moins long terme.

Il est recommandé de concevoir les études de toxicité systémique des dispositifs contenant des nanomatériaux les plus complètes possibles, incluant l'évaluation des paramètres cliniques, biologiques et anatomopathologiques. Il sera éventuellement nécessaire d'adapter le protocole expérimental et les durées d'exposition selon le caractère soluble ou insoluble des nanomatériaux et leur biopersistance sur le long terme. Selon la nature des nanomatériaux, des investigations histologiques complémentaires peuvent être effectuées. On pourra faire appel à des techniques plus adaptées aux nanomatériaux, comme la microscopie électronique à transmission ou confocale par exemple.

Comme nous l'avons vu dans ce rapport, certains organes ou systèmes sont potentiellement touchés par les nanomatériaux libres, même ceux protégés *a priori* par des barrières physiologiques. Ces systèmes et organes cibles potentiels méritent donc une investigation spécifique, tels que :

- le système cardio-respiratoire (poumon, cœur, vaisseaux sanguins...),
- le système nerveux (cerveau, moelle épinière, nerfs...),
- le système digestif (foie, estomac, pancréas, intestin...),
- le système lymphoïde (thymus, rate, nœuds lymphatiques, moelle osseuse...),
- le système uro-génital (reins, organes reproducteurs...).

III.B.9. Cancérogénicité, reprotoxicité et neurotoxicité

Enfin, les évaluations additionnelles (cancérogénicité, reproduction/développement, neurotoxicité...) doivent être mises en œuvre selon les risques associés à l'utilisation du dispositif médical en mode de fonctionnement normal et défectueux.

Bien que pour le moment, le manque de données ne permette pas d'affirmer que les nanomatériaux induisent une cancérogénicité, une neurotoxicité, une tératogénicité ou une reprotoxicité, le risque n'est pas exclu. En particulier, si les études toxico-cinétiques ont montré une accumulation et bio-persistance des nanomatériaux libres, il faudra aborder ce risque dans l'analyse des risques du dispositif médical selon ses indications thérapeutiques. Il faudra mettre en place des essais complémentaires le cas échéant pour les nanomatériaux, avec des adaptations éventuelles des tests actuels existants.

Présentement, la cancérogénicité et la reprotoxicité des dispositifs médicaux, décrites dans la norme NF EN ISO 10993-3^{244f}, sont fréquemment documentées au moyen de l'historique clinique et de la littérature scientifique. De manière générale, la génotoxicité peut induire une cancérogénicité. Néanmoins, la cancérogénicité peut exister en l'absence de génotoxicité. Ces deux risques doivent donc être considérés indépendamment dans l'analyse des risques. Ainsi, étant donné le manque de recul clinique, le risque de cancérogénicité doit être évalué dans l'analyse des risques du dispositif médical, selon notamment la destination du dispositif médical et les conclusions de l'évaluation toxico-cinétique.

De même, puisque le passage de nano-objets à travers la barrière placentaire est possible, il conviendra d'évaluer les risques de tératogénicité en fonction de l'utilisation du dispositif médical.

Quant à la neurotoxicité, elle n'est pas décrite dans la série des normes NF EN ISO 10993. Or, la capacité des nanomatériaux libres à traverser les barrières physiologiques (membranaire et nucléaire) et la barrière hémato-encéphalique notamment ne doit pas être négligée. Selon l'indication du dispositif médical et sa voie d'exposition, le risque de neurotoxicité méritera d'être investigué.

III.C. Analyse bénéfiques/risques

Tout dispositif médical en contact avec des tissus et fluides biologiques induit invariablement une réaction. Cette réponse de l'organisme peut être de sévérité variable, localisée au site ou provoquer des dommages à distance. Ainsi, on qualifiera de biocompatible un dispositif médical induisant une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique.

Il est donc important de garder à l'esprit que le risque existe pour tout produit étranger introduit dans l'organisme. Ainsi, tout comme n'importe quelle substance, certains nanomatériaux peuvent induire des réponses inappropriées dans l'utilisation prévue, alors que ce n'est pas le cas pour d'autres (même matériau sous forme macroscopique par exemple). Le risque est déterminé par la toxicité intrinsèque du produit multiplié par le degré d'exposition (quantité, type et durée de

contact...). Ces deux notions sont donc indissociables pour décider de la toxicité potentielle d'un dispositif médical.

Une plus petite taille ne signifie pas nécessairement une toxicité augmentée. Bien d'autres facteurs entrent en jeu comme la vitesse d'élimination, l'état chimique de surface, ou tout simplement la toxicité inhérente à l'espèce chimique étudiée. Malheureusement, les moyens techniques actuels ne permettent pas encore de déterminer avec précision les facteurs responsables de l'effet toxique observé. C'est pourquoi une analyse critique des résultats d'évaluation des risques biologiques sur le dispositif final comportant des nanomatériaux est absolument primordiale, pour éviter tout raisonnement erroné ou prématuré.

Une analyse de risque doit commencer par une description détaillée du dispositif médical et une caractérisation physico-chimique la plus complète possible du nanomatériau dans le dispositif. Une attention particulière devra être apportée aux nanomatériaux libres et aux produits de dégradation/d'usure nanométriques potentiels. De manière générale, toute évaluation de biocompatibilité d'un dispositif médical doit comporter deux volets d'analyse :

- les matières premières : il faut s'assurer que celles-ci ne sont pas nocives ;
- la mise en œuvre : il faut s'assurer que le procédé de mise en œuvre du dispositif médical final (mise en forme, nettoyage, conditionnement, stérilisation) ne laisse pas de résidus de fabrication pouvant être nocifs une fois le dispositif en contact avec les tissus/fluides biologiques.

L'analyse des risques devra prendre en compte les paramètres physico-chimiques du nanomatériau utilisé dans le dispositif médical final, ainsi que l'application prévue du dispositif (notamment la voie d'exposition), puisque le profil toxicologique peut fortement varier selon ces facteurs. Ce profil devra être confronté aux bénéfices attendus par l'intégration du nanomatériau dans le dispositif. Cette analyse du ratio bénéfices *versus* risques, doit être ensuite comparée aux alternatives à disposition. Lorsque l'analyse globale prouve qu'il y a de réels bénéfices par rapport aux risques potentiels, seulement alors l'usage du nanomatériau est justifié.

Un arbre décisionnel est proposé pour aider à la réflexion dans l'analyse des risques des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux ou ayant recours aux nanomatériaux (*cf.* Figure 3).

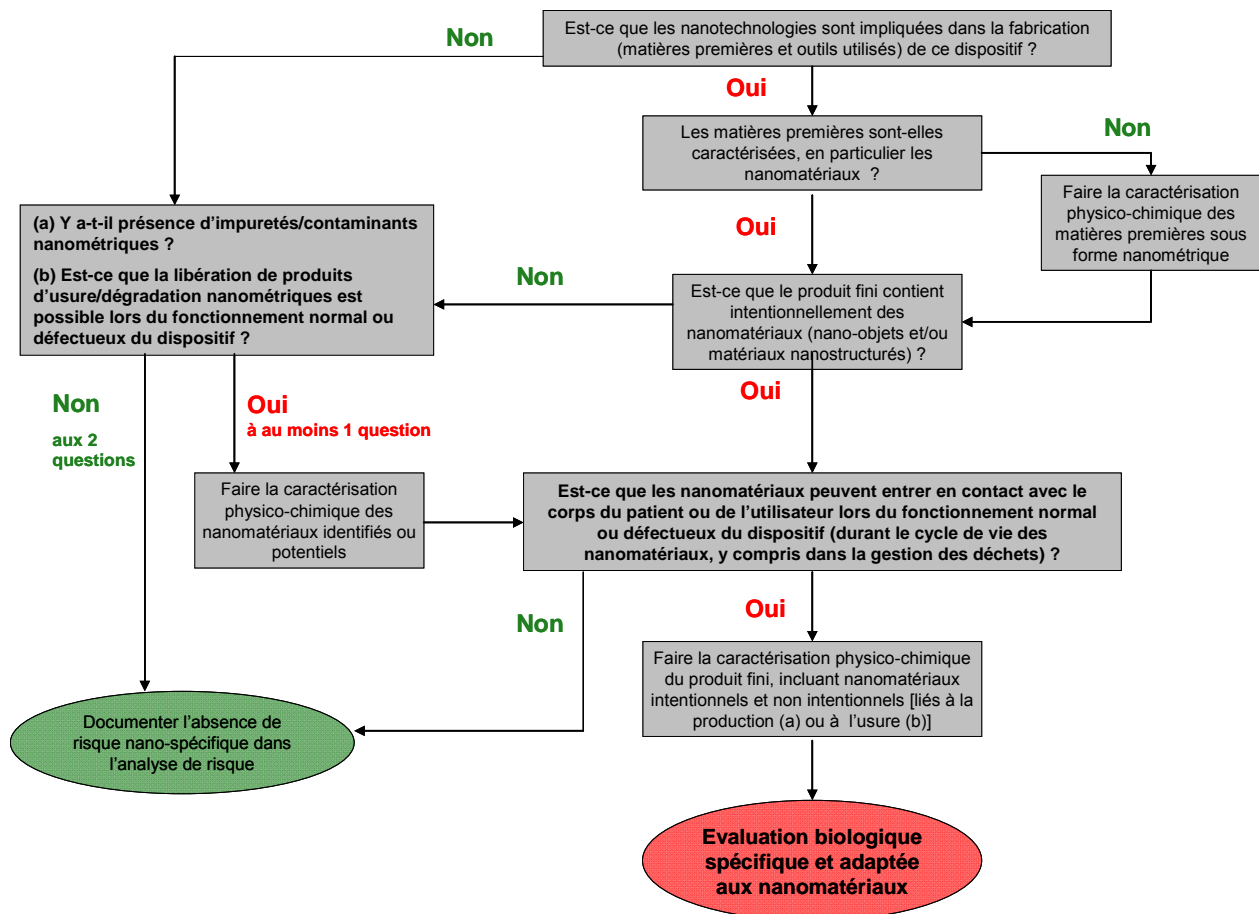


Figure 3. Analyse des risques nano-spécifiques pour les dispositifs médicaux

On parle de nanomatériaux intentionnels s'ils ont été volontairement intégrés dans la conception du dispositif médical. Dans le cas contraire, il s'agit de nanomatériaux non intentionnels.

Adapté à partir des travaux du groupe de travail européen New Emerging Technologies.

III.D. Autres référentiels

Le rapport sur les nanotechnologies établi par la Société Royale et l'Académie Royale d'Ingénierie (Royal Society et Royal Academy of Engineering)^{55d} en 2004 au Royaume Uni fait partie des premiers rapports pour évaluer les opportunités et les risques liés aux nanotechnologies, signe manifeste que les organismes de régulation se penchent de près sur la question. Un certain nombre de rapports d'autorités de régulation ont vu le jour, identifiant des actions et des priorités à apporter aux nanotechnologies. Tous appellent à plus de recherches dans la caractérisation des nanomatériaux et dans la compréhension de leurs effets sur la santé, la sécurité et l'environnement.

Dans le cadre de la Commission Européenne, divers Comités Techniques et Agences ont des groupes de travail dédiés aux nanotechnologies et ont publié des revues et des opinions scientifiques en la matière, résumées dans le rapport de 2008.²⁶⁰

La production, l'utilisation et la commercialisation des substances chimiques dans l'Union Européenne sont régies par REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*; enregistrement, évaluation, autorisation et restrictions des substances chimiques et de leurs usages). REACH fait porter aux fabricants la responsabilité d'évaluer et de gérer les risques

posés par les produits chimiques et de fournir des informations de sécurité adéquates à leurs utilisateurs. En principe, les exigences de REACH s'appliquent aux nanomatériaux. Cependant, ils ne bénéficient pas de clause spécifique. Notamment, le seuil minimal d'obligation d'enregistrement des substances manufacturées d'une tonne par an élimine *de facto*, de nombreux nanomatériaux dont la production n'atteint pas cette quantité. Toutefois, depuis 2008, des révisions sont en cours d'étude par le groupe CASG Nano (*REACH Competent Authorities Subgroup on Nanomaterials*, sous-groupe des autorités compétentes de REACH sur les nanomatériaux) pour adapter la réglementation REACH pour le cas particulier des nanomatériaux. De manière générale, les fabricants de dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux devraient donc s'assurer au préalable que les matières premières utilisées sont autorisées par REACH.

En dehors de l'Europe, les Etats-Unis, le Canada et l'Australie sont également très impliqués. Aux Etats-Unis, la FDA (*Food and Drug Administration*, autorité de régulation des aliments et des produits de santé) a reconnu depuis 2006 l'importance des nanotechnologies et a formé une Nanotechnology Task Force chargée d'examiner les mesures réglementaires concernant les produits contenant des nanomatériaux.

Par ailleurs, des normes et standards commencent à prendre en compte les spécificités particulières des nanomatériaux. Par exemple, quelques standards internationaux ASTM (*American Society for Testing and Materials*, société américaine pour les essais et les matériaux) sont spécifiques à l'évaluation des risques biologiques des nanomatériaux, dont :

- ASTM E2526 : méthode d'évaluation de la toxicité des nanomatériaux (analyse de leurs effets sur le rein et le foie, principaux organes d'excrétion des nanomatériaux),
- ASTM E2524 : protocole pour le test d'hémolyse,
- ASTM E2525 : méthode pour évaluer la stimulation ou l'inhibition par les nanoparticules sur certaines cellules issues de la moelle osseuse, dont les macrophages.

L'OCDE, qui travaille jusqu'à présent principalement sur la sécurité des produits chimiques, cherche également à harmoniser, standardiser et valider des tests et méthodes d'évaluation pour la sécurité sanitaire et environnementale des nanomatériaux. On peut ainsi trouver entre autres des recommandations dans les documents suivants :

- Guide pour tester les nanomatériaux manufacturés,²⁶¹
- Notes de guide préliminaire sur la préparation des échantillons et les unités de dose pour l'évaluation de la sécurité des nanomatériaux.²⁶²

Enfin, rattaché à l'organisation internationale de normalisation (ISO), un comité technique, l'ISO TC229, a pour tâche l'élaboration de normes concernant la terminologie et la nomenclature, la métrologie et l'instrumentation, incluant les spécifications pour les matériaux de référence, les méthodologies d'essai, le calcul et la simulation. Elles sont établies sur des bases scientifiques et sur

des pratiques liées à la santé, à la sécurité et à l'environnement. Actuellement, il y a 7 publications disponibles :

- ISO/TS 80004-1:2010 : Nanotechnologies -- Vocabulaire -- Partie 1: Termes «cœur»,
- ISO/TS 27687:2008 : Nanotechnologies -- Terminologie et définitions relatives aux nano-objets -- Nanoparticule, nanofibre et nanofeuillet,
- ISO/TS 80004-3:2010 : Nanotechnologies -- Vocabulaire -- Partie 3: Nano-objets en carbone,
- ISO/TR 11360:2010 : Nanotechnologies -- Méthodologie de classification et catégorisation des nanomatériaux,
- ISO 29701:2010 : Nanotechnologies -- Essai de détection d'endotoxines sur des échantillons de nanomatériaux pour des systèmes in vitro -- Essai au lysat d'améboocyte de Limule (LAL),
- ISO/TS 10867:2010 : Nanotechnologies -- Caractérisation de nanotubes de carbone monofeuillets en utilisant la spectroscopie de photoluminescence dans le proche infra-rouge,
- ISO/TR 12885:2008 : Nanotechnologies -- Pratiques de sécurité dans les arrangements professionnels relatifs aux nanotechnologies.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce rapport apporte des éléments concrets et des recommandations sur l'utilisation des nanomatériaux dans les dispositifs médicaux, tant en termes de bénéfices que de risques potentiels. Ces travaux se sont focalisés essentiellement sur l'évaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux qui sont susceptibles d'être en contact avec le corps du patient ou de l'utilisateur.

Les propriétés particulières des nanomatériaux, celles-là même qui améliorent la performance des dispositifs médicaux et qui apportent des bénéfices notables démontrés pour les patients, inquiètent en raison de leur nouveauté. La question de leurs effets néfastes sur la santé est au centre de multiples débats. De nombreux projets de recherche tentent de combler les lacunes dans la connaissance de la toxicité potentielle des nanomatériaux, mais les données en la matière restent incomplètes et parfois divergentes. S'il est reconnu que certains nanomatériaux, dans des conditions expérimentales données, peuvent induire des effets toxiques sur l'organisme, on ne peut néanmoins parler d'un danger spécifique lié à ces nouveaux matériaux, car les risques dépendent d'un grand nombre de facteurs, tels que le type de nanomatériau, la voie d'exposition, la quantité et la fréquence d'exposition, etc.

Les méthodologies pour caractériser et évaluer tous les aspects de l'éventuelle toxicité des nanomatériaux sont toujours en cours de développement. Les interprétations des données entre laboratoires sont encore difficiles, entre autres par manque de nanomatériaux de référence. La pertinence de certains tests toxicologiques utilisés pour les matériaux conventionnels doit être établie puis validée. Par conséquent, en raison de cette faiblesse technique, il est probable que l'évaluation des risques biologiques est encore incertaine.

Dans ce contexte, l'évaluation des risques reste à réaliser au cas par cas. Plus précisément, compte tenu de tous les éléments exposés dans ce rapport, il faudra mener une analyse approfondie des risques pour les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Face aux risques potentiels engendrés par la présence des nanomatériaux dans le dispositif, il faudra en attendre un bénéfice majeur, pour pouvoir justifier de leur usage.

Les référentiels actuels concernant les dispositifs médicaux, qu'ils soient réglementaires ou normatifs, sont applicables pour l'évaluation des risques biologiques des dispositifs médicaux

contenant des nanomatériaux. En effet, mises à part quelques adaptations des procédures expérimentales et des précautions dans l'interprétation des résultats, ils offrent un cadre facilitant l'identification et la gestion de l'ensemble des risques associés à l'utilisation du dispositif. L'aboutissement de ce travail a permis l'élaboration de recommandations à destination des fabricants de dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux par analyser et évaluer au mieux les risques biologiques, durant le cycle de vie du dispositif médical : de la conception au recyclage après usage, en passant par son utilisation.

Afin d'élargir sa portée, le rapport sera transmis aux instances internationales (Commission Européenne, ISO, CEN, autorités compétentes européennes...). Les autorités compétentes dans le domaine des dispositifs médicaux devraient exercer une surveillance attentive de ce type de dispositifs médicaux.

En vue de garantir un niveau élevé de sécurité, il sera par ailleurs envisageable de faire évoluer la classification des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux qui sont susceptibles d'être en contact avec le corps du patient ou de l'utilisateur.

Le monde des nanotechnologies en constante évolution constitue un réel défi pour les scientifiques comme pour les autorités nationales de régulation. La diversité des nanomatériaux, leurs propriétés potentiellement en rupture avec les matériaux conventionnels ainsi que leur extrême nouveauté suscitent de nombreuses questions, auxquelles il n'est pas encore possible de répondre. Nous ne sommes qu'aux premières connaissances dans le domaine et les outils nécessaires à la compréhension n'en sont qu'aux balbutiements. Pour faire avancer la connaissance et l'innovation tout en garantissant une meilleure maîtrise des risques, des actions coordonnées multidisciplinaires et internationales sont attendues de la part des institutions compétentes concernées. L'Afssaps porte une attention spécifique sur les nouveaux dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux mis sur le marché français

RECOMMANDATIONS A L'ATTENTION DES FABRICANTS SUR L'EVALUATION BIOLOGIQUE DES DISPOSITIFS MEDICAUX CONTENANT DES NANOMATERIAUX

Ces recommandations doivent être lues avec le rapport scientifique associé, intitulé « Evaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux » et publié par l'Afssaps.

De façon générale, les référentiels existants (directives, guides et normes harmonisées...) offrent un cadre de travail approprié pour évaluer les risques biologiques associés aux dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux, susceptibles d'être en contact avec le corps du patient ou de l'utilisateur. Il semble néanmoins nécessaire d'explicitier certaines recommandations pour l'évaluation des risques nano-spécifiques.

• ***Evaluation du rapport bénéfices/risques :***

Le profil toxicologique devra être confronté aux bénéfices attendus résultant de l'intégration du nanomatériau dans le dispositif médical. Le ratio bénéfices *versus* risques devra ensuite être comparé à celui obtenu avec les alternatives à disposition. Lorsque l'analyse globale prouve qu'il y a de réels bénéfices par rapport aux risques potentiels, alors seulement l'usage du nanomatériau semble justifié.

• ***Transparence de l'information :***

Afin d'assurer la transparence de l'information sur la présence de nanomatériaux, il est indispensable de mentionner explicitement dans la notice l'usage de nanomatériaux dans le dispositif médical, susceptibles d'être en contact avec le corps du patient ou de l'utilisateur.

• ***Identification et caractérisation des matériaux utilisés :***

De manière générale, comme pour tout dispositif médical, le fabricant devra s'assurer que ses matières premières sont dûment caractérisées et qu'elles sont autorisées dans le cadre du règlement européen REACH en vigueur. Une attention particulière sera accordée à la caractérisation des nanomatériaux (nano-objets et matériaux nanostructurés), les caractéristiques pouvant changer au cours du temps et de leur cycle de vie.

Pour cette même raison, la caractérisation physico-chimique du produit final contenant des nanomatériaux devra également être effectuée, avant toute évaluation des risques biologiques.

De même, pour que l'évaluation des risques biologiques soit valable, il faudra s'assurer à la fois de la conformité et de la reproductibilité de la production des lots du produit final.

Etant donné que les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux, susceptibles d'être en contact avec le corps du patient ou de l'utilisateur, peuvent au cours du temps s'user, se dégrader et libérer des débris de taille nanométrique, la biodégradation devra être dûment évaluée dans l'analyse des risques du dispositif, dans les conditions d'utilisation et aux fins prévues. Le cas échéant, la mesure et la caractérisation précises des nanoparticules libérées dans des conditions physiologiques similaires aux conditions normales d'utilisation seront nécessaires. La cinétique de libération, la quantité et le devenir biologique des nanoparticules libérées devront être étudiés.

Les paramètres physico-chimiques les plus pertinents pour l'évaluation des risques biologiques d'un nanomatériau sont les suivants : taille et distribution de taille, morphologie, état d'agrégation/agglomération, solubilité et dispersibilité, surface spécifique, composition (chimique et structure cristallographique, entre autres), charge de surface, état de surface. Ceux retenus dans l'évaluation des risques biologiques doivent être mûrement réfléchis en fonction du dispositif médical contenant des nanomatériaux et de son usage, puisque le profil toxicologique peut fortement varier selon ses caractéristiques physico-chimiques. Il conviendra de préciser pour chaque paramètre mesuré sus-mentionné la méthode utilisée et l'incertitude de mesure. Il conviendra de s'assurer également que les mesures soient effectuées sur un nombre suffisant d'échantillons.

Une évaluation quantitative et qualitative des impuretés doivent être réalisées en particulier une caractérisation physico-chimique, toxicologique et biologique doivent être disponibles. Toute absence de caractérisation des impuretés doit être justifiée. En raison de la forte propension des nanomatériaux à adsorber les impuretés, il est fortement recommandé de vérifier leur absence en routine, pour la libération des lots par un test de pyrogénicité par exemple.

• **Précautions dans l'évaluation des risques biologiques :**

De manière générale, la toxicité est spécifique du nanomatériau testé et ne peut être généralisée ou extrapolée, même au sein d'une même famille chimique. De plus, la notion d'équivalence entre nanomatériaux n'est *a priori* pas acceptable, car difficilement démontrable.

Selon la réglementation en vigueur, l'évaluation des risques biologiques est effectuée sur le produit fini. Cette démarche reste valable pour les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Cependant, l'évaluation biologique sur le produit fini peut être satisfaisante, alors que celle sur les nanomatériaux seuls ne le serait pas. En conséquence, et au vu d'une analyse des risques faisant apparaître la possibilité de contact des nanomatériaux avec l'organisme, il pourra s'avérer nécessaire de réaliser l'évaluation biologique des nanomatériaux seuls, notamment les essais en rapport avec des risques majeurs comme la génotoxicité ou la cancérogénicité.

Il est fortement recommandé de mener à bien des études toxico-cinétiques pertinentes sur les nanomatériaux libres et/ou les produits d'usure/dégradation de taille nanométrique. La méthodologie pourra être inspirée des études conduites sur les médicaments (type ADME – Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination). L'étude de la biodistribution pourra être réalisée en utilisant un marquage adéquat (ex. : fluorescent ou radioactif) qui ne devra pas modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques des nanomatériaux libres et qui devra rester solidement attaché aux nanomatériaux tout le long de l'étude.

Dans les essais biologiques, la masse ou la surface, unités classiquement utilisées pour la préparation des échantillons soumis à l'essai, ne sont pas nécessairement pertinentes et suffisantes dans le cas des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Si l'évaluation des risques biologiques semble mieux rendre compte de la réalité lorsque les gammes de concentration sont exprimées en fonction d'autres unités (surface spécifique, nombre de particules...), alors ces modifications sont recommandées et doivent être documentées dans l'analyse de risque. De même, pour la préparation des échantillons des dispositifs médicaux dans le cadre des essais biologiques, il pourrait s'avérer judicieux d'effectuer les extractions en fonction non pas de la masse, mais de la surface spécifique.

On s'assurera d'effectuer l'évaluation des risques biologiques dans les conditions expérimentales reflétant au mieux les conditions cliniques, par exemple en termes de voie d'exposition, de quantité et fréquence d'exposition ou d'agrégation/agglomération.

Une grande attention devra être apportée à la reproductibilité, la fiabilité et la sensibilité des essais de toxicité *in vitro* choisis, avant toute interprétation hâtive. Notamment une attention particulière devra être apportée à d'éventuelles interférences des nanomatériaux avec les tests recourant aux agents colorimétriques et fluorescents, comme ceux utilisés dans les essais de cytotoxicité. Si tel est le cas, la corroboration de plusieurs résultats provenant de différentes méthodologies s'avérera nécessaire pour une interprétation scientifiquement pertinente.

L'évaluation de l'hémocompatibilité devra être effectuée pour les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux qui sont en contact direct ou indirect avec le sang. De plus, si l'étude toxico-cinétique fait apparaître la possibilité de migration de particules nanométriques libres issues du dispositif dans la circulation sanguine, alors l'hémocompatibilité devra être également étudiée.

Comme pour tout type de dispositif médical, afin d'évaluer la génotoxicité du produit, il est recommandé de réaliser plusieurs tests, à savoir au moins deux tests *in vitro* différents et un test *in vivo*. Il faudra également s'assurer de la pertinence des tests utilisés (risque de résultats faussement négatifs avec le test d'Ames, durée des tests...) avec les nanomatériaux étudiés et le cas échéant, les adapter ou envisager d'autres essais plus adéquats.

Comme certains travaux scientifiques suggèrent que les nanomatériaux pourraient influencer le système immunitaire, le risque d'hypersensibilité retardée et plus généralement de la sensibilisation, devra être évalué. L'analyse des risques devra évaluer la nécessité d'effectuer des essais d'immunotoxicologie.

Il est recommandé de concevoir les études de toxicité systémique des dispositifs contenant des nanomatériaux les plus complètes possibles, incluant l'évaluation des paramètres cliniques, biologiques, et anatomopathologiques. Selon la nature des nanomatériaux, des investigations histologiques complémentaires devront être effectuées.

Etant donné le manque de recul clinique, le risque de cancérogénicité doit être évalué dans l'analyse des risques du dispositif médical, selon notamment la destination du dispositif médical et les conclusions de l'évaluation toxico-cinétique.

De même, si l'accumulation des nanomatériaux libres dans certains tissus spécifiques (organes reproducteurs, système nerveux central...) et/ou leur passage à travers des barrières physiologiques (placentaire, hémato-encéphalique...) est possible, il conviendra d'investiguer leurs effets toxiques sur la reproduction, leur tératogénicité et leurs effets neurotoxiques.

En conclusion, les approches expérimentales actuelles offrent un cadre de travail et une base de réflexion appropriés pour l'évaluation des risques biologiques des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux, avec des adaptations au cas par cas si nécessaire. Bien que les outils analytiques et les méthodologies expérimentales attendent d'être modifiés et développés pour l'étude des nanomatériaux, des données sur leurs propriétés doivent être générées et collectées, afin de

comblent les nombreuses lacunes dans leur connaissance. La démarche pour appréhender la problématique des risques sanitaires relative à l'utilisation des nanomatériaux dans les dispositifs médicaux doit être prudente et progressive, tout en gardant à l'esprit le rapport bénéfices/risques.

Dans le cadre de son activité de surveillance du marché, l'Afssaps porte une attention spécifique sur les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux ayant récemment obtenus le marquage CE et nouvellement mis sur le marché français. Et en amont du marquage CE, elle peut proposer un suivi particulier du développement dans le cadre de sa démarche globale d'accompagnement de l'innovation dans le but de favoriser l'accès rapide des patients aux innovations médicales tout en encadrant les risques induits par ces nouvelles technologies.

GLOSSAIRE

ADME : absorption, distribution, métabolisme et élimination

ADN : acide désoxyribonucléique

AFM (*Atomic Force Microscope*) : microscope à force atomique

AFNOR : Association Française de Normalisation

Afssaps : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

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

ASTM (*American Society for Testing and Materials*) : société américaine pour les essais et les matériaux

ATP : Adénosine triphosphate

BET : méthode de mesure développée par Brunauer, Emmett et Teller

CASG Nano (*REACH Competent Authorities subgroup on Nanomaterials*) : sous-groupe des autorités compétentes de REACH sur les nanomatériaux

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique

CTAB : bromure de cétyltriméthylammonium, un surfactant cationique

DLS (*Dynamic Light Scattering*) : diffusion dynamique de la lumière (technique d'analyse spectroscopique)

DM : dispositif médical

DMDIV : dispositif médical de diagnostic *in vitro*

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) : milieu de culture cellulaire

DMIA : dispositif médical implantable actif

Fc : portion d'une molécule d'immunoglobuline qui peut être cristallisée et qui est formée par les régions constantes des deux chaînes lourdes de l'immunoglobuline

FDA (*Food and Drug Administration*) : agence de régulation des aliments et des produits de santé aux Etats-Unis

Bis-GMA : polymère constitué de bisphénol A glycidyl méthacrylate

IARC (*International Agency for Research on Cancer*): Agence internationale pour la recherche sur le cancer

IgG : Immunoglobuline G (anti-corps)

IL : interleukine

INM : institut national de métrologie

INT : 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tétrazolium chlorure, réactif colorimétrique utilisé dans un test de cytotoxicité

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

LDH : lactate déshydrogénase

LLNA (*Local Lymph Node Assay*) : essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques

MEMS/NEMS : systèmes micro/nano-électromécaniques

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium, réactif colorimétrique utilisé dans un test de cytotoxicité

MWCNT (*Multi-Walled Carbon Nanotube*) : nanotube de carbone multi-feuillets

NTC : nanotube de carbone

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

PBS (*Phosphate buffered saline*) : Tampon phosphate salin

PDMA : polydiméthylacrylamide

PEG : polyéthylène glycol
PGLA : poly(acide lactique-co-glycolique)
PHDCA : polyhexadécylcyanoacrylate
PNIPAM : poly(N-isopropylacrylamide)

REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) : enregistrement, évaluation, autorisation et restrictions des substances chimiques et leurs usages
RGD : séquence peptidique composée d'Arginine, de Glycine et d'Acide aspartique
ROS (*Reactive Oxygen Species*) : Espèces réactives de l'oxygène

SEM (*Scanning Electron Microscope*): microscope électronique à balayage
SNC : système nerveux central
SPIO (*Super Paramagnetic Iron Oxide*) : Oxyde de Fer Super Paramagnétique
STM (*Scanning Tunneling Microscope*) : microscope à effet tunnel
SVF : Sérum de Veau Fœtal
SWCNT (*Single-Walled Carbon Nanotube*) : nanotube de carbone mono-feuillet

β-TCP (*β-tricalciumphosphate*) : phosphate de calcium
TEDMA : polymère constitué de tétraéthylène glycol diméthacrylate
TEGDMA : polymère constitué de triéthylène glycol diméthacrylate
TEM (*Transmission Electron Microscope*): microscope électronique à transmission
TEP : Tomographie par émission de position
TGF-β (*Transforming growth factor*) : cytokine polypeptidique qui agit comme élément anti-rejet
Th(1, 2, 17) : type de réponse immunitaire
TLRs (*Toll-like receptors*) : Récepteurs de type Toll, une familles de récepteurs biologiques
THF : tétrahydrofurane (solvant organique)
TNF (*Tumor Necrosis Factor*) : facteur de nécrose tumorale, une cytokine impliquée dans les réactions immunitaires
Treg : cellules lymphocytaires T régulatrices impliquées dans le contrôle des réactions auto-immunes

USA (*United States of America*) : Etats-Unis
UV : Ultra-violet

WST : 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazole de sodium, réactif colorimétrique utilisé dans un test de cytotoxicité

XTT : 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro- 5-sulfophényl)-2H-tétrazolium- 5-carboxanilide de sodium, réactif colorimétrique utilisé dans un test de cytotoxicité

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Oberdörster, G.; Maynard, A.; Donaldson, K.; Castranova, V.; Fitzpatrick, J.; Ausman, K.; Carter, J.; Karn, B.; Kreyling, W.; Lai, D.; Olin, S.; Monteiro-Riviere, N.; Warheit, D.; Yang, H.; Group, A. r. f. t. I. R. F. R. S. I. N. T. S. W., Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology* **2005**, *2* (1), 8.
2. (a) ISO/TS 27687 : 2008, Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - nanoparticle, nanofibre and nanoplate. 2008; (b) ISO/TS 80004-1, Nanotechnologies - Vocabulary - Part 1 : Core Terms. in press.
3. Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N., Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* **2006**, *311* (5761), 622-627.
4. Ford, W. T., Inorganic-Organic composite. In *Nanoscale Materials in Chemistry*, 2 ed.; Klabunde, K. J.; Richards, R. M., Eds. John Wiley & Sons Inc.: New Jersey, 2009; pp 1-13.
5. (a) Preining, O., The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. *Journal of Aerosol Science* **1998**, *29* (5-6), 481-495; (b) Jones, C. F.; Grainger, D. W., In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61* (6), 438-456; (c) Skebo, J. E.; Grabinski, C. M.; Schrand, A. M.; Schlager, J. J.; Hussain, S. M., Assessment of Metal Nanoparticle Agglomeration, Uptake, and Interaction Using High-Illuminating System. *International Journal of Toxicology* **2007**, *26* (2), 135-141; (d) Petosa, A. R.; Jaisi, D. P.; IQuevedo, v. R.; Elimelech, M.; Tufenkji, N., Aggregation and Deposition of Engineered Nanomaterials in Aquatic Environments: Role of Physicochemical Interactions. *Environmental Science & Technology* **2010**, *44* (17), 6532-6549
6. Jiang, J.; Oberdörster, G.; Biswas, P., Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* **2009**, *11* (1), 77-89-89.
7. (a) Abdellaoui, M.; Djega-Mariadassou, C.; Gaffet, E., Structural study of Fe---Si nanostructured materials. *Journal of Alloys and Compounds* **1997**, *259* (1-2), 241-248; (b) Gaffet, E.; Faudot, F.; Harmelin, M., Crystal-to-amorphous phase transition induced by mechanical alloying in the Ge---Si system. *Materials Science and Engineering: A* **1991**, *149* (1), 85-94.
8. Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M., Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Rev* **2005**, *105*, 1025-102.
9. Meyers, M. A.; Mishra, A.; Benson, D. J., Mechanical properties of nanocrystalline materials. *Progress in Materials Science* **2006**, *51* (4), 427-556.
10. Cao, G., *Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications*. Imperial College Press: London, 2004.
11. Gleiter, H., Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta Mater.* **2000**, *48*, 1-29.
12. Klabunde, K. J., Introduction to nanoscale materials in chemistry. In *Nanoscale Materials in Chemistry*, 2 ed.; Klabunde, K. J.; Richards, R. M., Eds. John Wiley & Sons Inc.: New Jersey, 2009; pp 1-13.
13. Flohrer, S.; Herzer, G., Random and uniform anisotropy in soft magnetic nanocrystalline alloys (invited). *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2010**, *322* (9-12), 1511-1514.
14. Shull, R. D., Nanocrystalline and Nanocomposite Magnetic Materials and Their Applications. *Journal of Iron and Steel Research, International* **2007**, *14* (4), 69-74.
15. Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G.; Rau, B.; Gellermann, J.; Riess, H.; Felix, R.; Schlag, P. M., Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The Lancet Oncology* **2002**, *3* (8), 487-497.
16. Dorozhkin, S. V., Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6* (3), 715-734.
17. Watari, F.; Takashi, N.; Yokoyama, A.; Uo, M.; Akasaka, T.; Sato, Y.; Abe, S.; Totsuka, Y.; Tohji, K., Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects. *Journal of The Royal Society Interface* **2009**, *6* (Suppl 3), S371-S388.
18. (a) Liu, H.; Webster, T. J., Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* **2007**, *28* (2), 354-369; (b) Jäger, M.; Zilkens, C.; Zanger, K.; Krauspe, R., Significance of nano- and microtopography for cell-surface interactions in orthopaedic implants. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2007**, *8*, 19.

19. Ward, B. C.; Webster, T. J., The effect of nanotopography on calcium and phosphorus deposition on metallic materials in vitro. *Biomaterials* **2006**, *27* (16), 3064-3074.
20. Sato, M.; Webster, T. J., Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert Rev. Medical Devices* **2004**, *1* (1), 105-114.
21. Webster, T. J.; Ejiogor, J. U., Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* **2004**, *25* (19), 4731-4739.
22. (a) Conseil des Communautés Européennes, Directive 93/42/CEE relative aux dispositifs médicaux. 1993; (b) Parlement Européen; Conseil de l'Union Européenne, Directive 2007/47/CE relative aux dispositifs médicaux. 2007.
23. Roszek, B.; De Jong, W. H.; Geertsma, R. E., RIVM report - Nanotechnology in medical applications: state-of-the-art in materials and devices. Bilthoven, 2005; Vol. 265001001/2005.
24. Ip, M.; Lui, S. L.; Poon, V. K. M.; Lung, I.; Burd, A., Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med Microbiol* **2006**, *55* (1), 59-63.
25. (a) Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* **2009**, *27* (1), 76-83; (b) Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J.-H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C.-Y.; Kim, Y.-K.; Lee, Y.-S.; Jeong, D. H.; Cho, M.-H., Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2007**, *3* (1), 95-101.
26. Wright, J. B.; Lam, K.; Burrell, R. E., Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment. *Am J Infect Control* **1998**, *26* (6), 572-7.
27. Wright, J. B.; Lam, K.; Hansen, D.; Burrell, R. E., Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *Am J Infect Control* **1999**, *27* (4), 344-50.
28. Yin, H. Q.; Langford, R.; Burrell, R. E., Comparative evaluation of the antimicrobial activity of ACTICOAT antimicrobial barrier dressing. *J Burn Care Rehabil* **1999**, *20* (3), 195-200.
29. Dunn, K.; Edwards-Jones, V., The role of Acticoat(TM) with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns* **2004**, *30* (Supplement 1), S1-S9.
30. Sawai, J., Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal of Microbiological Methods* **2003**, *54* (2), 177-182.
31. Mannsfeld, S. C. B.; Tee, B. C. K.; Stoltenberg, R. M.; Chen, C. V. H. H.; Barman, S.; Muir, B. V. O.; Sokolov, A. N.; Reese, C.; Bao, Z., Highly sensitive flexible pressure sensors with microstructured rubber dielectric layers. *Nat Mater* **2010**, advance online publication.
32. Li, Z.; Zhu, G.; Yang, R., Muscle-Driven In Vivo Nanogenerator. *Advanced Materials* **2010**, *22* (23), 2534-2537.
33. Kim, D.-H.; Viventi, J.; Amsden, J. J.; Xiao, J.; Vigeland, L.; Kim, Y.-S.; Blanco, J. A.; Panilaitis, B.; Frechette, E. S.; Contreras, D.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G.; Huang, Y.; Hwang, K.-C.; Zakin, M. R.; Litt, B.; Rogers, J. A., Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics. *Nat Mater* **2010**, *9* (6), 511-517.
34. Bardhan, R.; Chen, W.; Perez-Torres, C.; Bartels, M.; Huschka, R. M.; Zhao, L. L.; Morosan, E.; Pautler, R. G.; Joshi, A.; Halas, N. J., Nanoshells with Targeted Simultaneous Enhancement of Magnetic and Optical Imaging and Photothermal Therapeutic Response *Advanced Functional Materials* **2009**, *19*, 3901-3909.
35. Freitas, R. A., Current Status of Nanomedicine and Medical Nanorobotics. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience* **2005**, *2*, 1-25.
36. Lu, H.; Lee, Y. K.; Oguri, M.; Powers, J. M., Properties of a Dental Resin Composite with a Spherical Inorganic Filler. *Operative Dentistry* **2006**, *31* (6), 734-740.
37. (a) Chen, H.; Clarkson, B. H.; Sun, K.; Mansfield, J. F., Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into an enamel prism-like structure. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *288* (1), 97-103; (b) Hannig, C.; Hannig, M., Natural enamel wear - A physiological source of hydroxylapatite nanoparticles for biofilm management and tooth repair? *Medical Hypotheses* **2010**, *74* (4), 670-672.
38. Alt, V.; Bechert, T.; Steinrücke, P.; Wagener, M.; Seidel, P.; Dingeldein, E.; Domann, E.; Schnettler, R., An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* **2004**, *25* (18), 4383-4391.
39. Welt, F. G. P.; Rogers, C., Inflammation and Restenosis in the Stent Era. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2002**, *22* (11), 1769-1776.
40. Tsujino, I.; Ako, J.; Honda, Y.; Fitzgerald, P. J., Drug delivery via nano-, micro and macroporous coronary stent surfaces. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2007**, *4* (3), 287-295.

41. Costa, J. R., Jr.; Abizaid, A.; Costa, R.; Feres, F.; Tanajura, L. F.; Abizaid, A.; Maldonado, G.; Staico, R.; Siqueira, D.; Sousa, A. G. M. R.; Bonan, R.; Sousa, J. E., 1-Year Results of the Hydroxyapatite Polymer-Free Sirolimus-Eluting Stent for the Treatment of Single De Novo Coronary Lesions: The VESTASYNC I Trial. *Journal of the American College of Cardiology: Cardiovascular Interventions* **2009**, *2* (5), 422-427.
42. Termonia, Y., Structure-property relationships in nanocomposites. *Polymer* **2007**, *48* (23), 6948-6954.
43. Kumbara, S. G.; Nukavarapua, S. P.; James, R.; Hogana, M. V.; Laurencin, C. T., Recent Patents on Electrospun Biomedical Nanostructures: An Overview. *Recent Patents on Biomedical Engineering* **2008**, *1*, 68-78.
44. Raghunath, J.; Zhang, H.; Edirisinghe, M. J.; Darbyshire, A.; Butler, P. E.; Seifalian, A. M., A new biodegradable nanocomposite based on polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocages: cytocompatibility and investigation into electrohydrodynamic jet fabrication techniques for tissue-engineered scaffolds. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2009**, *052* (1), 1-8.
45. Chang, W. C.; Hawkes, E. A.; Kliot, M.; Sretavan, D. W., In Vivo Use of A Nanoknife for Axon Microsurgery. *Neurosurgery* **2007**, *61* (4), 683-692 10.1227/01.NEU.0000298896.31355.80.
46. Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, A. M., Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology* **2010**, *In Press, Corrected Proof*.
47. Freitas, R. A. J., Nanotechnology, Nanomedicine and Nanosurgery *International Journal of Surgery* **2005**, *3* (4), 243-246.
48. (a) van Landeghem, F. K. H.; Maier-Hauff, K.; Jordan, A.; Hoffmann, K.-T.; Gneveckow, U.; Scholz, R.; Thiesen, B.; Brück, W.; von Deimling, A., Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **2009**, *30* (1), 52-57; (b) Maier-Hauff, K.; Ulrich, F.; Nestler, D.; Niehoff, H.; Wust, P.; Thiesen, B.; Orawa, H.; Budach, V.; Jordan, A., Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* **2010**, 1-8-8.
49. Schwartz, J. A.; Shetty, A. M.; Price, R. E.; Stafford, R. J.; Wang, J. C.; Uthamanthil, R. K.; Pham, K.; McNichols, R. J.; Coleman, C. L.; Payne, J. D., Feasibility Study of Particle-Assisted Laser Ablation of Brain Tumors in Orthotopic Canine Model. *Cancer Research* **2009**, *69* (4), 1659-1667.
50. Fissell, W. H.; Fleischman, A. J.; Humes, H. D.; Roy, S., Development of continuous implantable renal replacement: past and future. *Transl Res* **2007**, *150* (6), 327-36.
51. Schrand, A. M.; Huang, H.; Carlson, C.; Schlager, J. J.; Ōsawa, E.; Hussain, S. M.; Dai, L., Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic? *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (1), 2-7
52. Cavalcanti, A.; Shirinzadeh, B.; Kretly, L. C., Medical nanorobotics for diabetes control. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2008**, *4* (2), 127-138.
53. Barone, P. W.; Yoon, H.; Ortiz-Garcia, R.; Zhang, J.; Ahn, J.-H.; Kim, J.-H.; Strano, M. S., Modulation of Single-Walled Carbon Nanotube Photoluminescence by Hydrogel Swelling. *ACS Nano* **2009**, *3* (12), 3869-3877.
54. Karlsson, H. L.; Gustafsson, J.; Cronholm, P.; Möller, L., Size-dependent toxicity of metal oxide particles--A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters* **2009**, *188* (2), 112-118.
55. (a) SCENHIR *Opinion on the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the technical guidance documents for new and existing substances for assessing the risks of nanomaterial*; Directorate-General for Health & Consumers, European Commission: 2007; (b) SCENHIR *Risk Assessment of Products of Nanotechnologies*; Directorate-General for Health & Consumers, European Commission: 2009; (c) Afsset *Evaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement*, Saisine n°2008/005; Groupe de travail "Nanomatériaux - exposition du consommateur et de l'environnement": Maisons-Alfort, 2010; (d) Royal Society; Royal Academy of Engineering *Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties*; London, 2004; (e) De Jong, W. H.; Roszek, B.; Geertsma, R. E., RIVM report - Nanotechnology in medical applications: possible risks for human health. Bilthoven, 2005; Vol. 265001002/2005; (f) Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J., Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect*. **2005**, *113* (7), 823-839; (g) Savolainen, K.; Alenius, H.; Norppa, H.; Pylkkänen, L.; Tuomi, T.; Kasper, G., Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies--A review. *Toxicology* **2010**, *269* (2-3), 92-104; (h) Savolainen, K.; Pylkkänen, L.; Norppa, H.; Falck, G.; Lindberg, H.; Tuomi, T.; Vippola, M.; Alenius, H.; Hämeri, K.; Koivisto, J.; Brouwer, D.; Mark, D.; Bard, D.; Berges, M.; Jankowska, E.; Posniak, M.; Farmer, P.; Singh, R.; Krombach, F.; Bihari, P.; Kasper, G.; Seipenbusch, M., Nanotechnologies, engineered nanomaterials and occupational health and safety - A review. *Safety Science* **2010**, *48* (8), 957-963; (i) Borm, P.; Robbins, D.; Haubold, S.; Kuhlbusch, T.; Fissan, H.; Donaldson, K.; Schins, R.; Stone, V.; Kreyling, W.; Lademann, J.; Krutmann, J.; Warheit, D.; Oberdörster, E., The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* **2006**, *3* (1), 11; (j) Buzea, C.; Pachecob, I. I.; Robbie, K., Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* **2007**, *2* (4), MR17-71; (k) Maynard, A. D., Nanotechnology: The Next Big Thing, or Much Ado about Nothing? *Annals of Occupational Hygiene* **2007**, *51* (1), 1-12; (l) Warheit, D. B.; Sayes, C. M.; Reed, K. L.; Swain, K. A.,

Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacology & Therapeutics* **2008**, *120* (1), 35-42.

56. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggård, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S., Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (7), 2050-2055.

57. Muthusamy, B.; Hanumanthu, G.; Suresh, S.; Rekha, B.; Srinivas, D.; Karthick, L.; Vrushabendra, B.; Sharma, S.; Mishra, G.; Chatterjee, P.; Mangala, K.; Shivashankar, H.; Chandrika, K.; Deshpande, N.; Suresh, M.; Kannabiran, N.; Niranjana, V.; Nalli, A.; Prasad, T. K.; Arun, K.; Reddy, R.; Chandran, S.; Jadhav, T.; Julie, D.; Mahesh, M.; John, S.; Palvankar, K.; Sudhir, D.; Bala, P.; Rashmi, N.; Vishnupriya, G.; Dhar, K.; Reshma, S.; Chaerkady, R.; Gandhi, T.; Harsha, H.; Mohan, S. S.; Deshpande, K.; Sarker, M.; Pandey, A., Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research. *PROTEOMICS* **2005**, *5*, 3531-3536.

58. (a) Lynch, I.; Dawson, K. A., Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **2008**, *3* (1-2), 40-47; (b) Aggarwal, P.; Hall, J.; McLeland, C.; Dobrovolskaia, M.; McNeil, S., Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drugs Deliv Rev.* **2009**, *61*, 429-437.

59. Göppert, T. M.; Müller, R. H., Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, *302* (1-2), 172-186.

60. (a) Gessner, A.; Lieske, A.; Paulke, B. R.; Müller, R. H., Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2002**, *54* (2), 165-170; (b) Patil, S.; Sandberg, A.; Heckert, E.; Self, W.; Seal, S., Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* **2007**, *28* (31), 4600-4607.

61. Owens, D. E.; Peppas, N. A., Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *307* (1), 93-102.

62. Brown, D. M.; Dickson, C.; Duncan, P.; Al-Attali, F.; Stone, V., Interaction between nanoparticles and cytokine proteins: impact on protein and particle functionality. *Nanotechnology* **2010**, *21* (21), 215104.

63. Scopelliti, P. E.; Borgonovo, A.; Indrieri, M.; Giorgetti, L.; Bongiorno, G.; Carbone, R.; Podestà, A.; Milani, P., The Effect of Surface Nanometre-Scale Morphology on Protein Adsorption. *PLoS ONE* **2010**, *5* (7), e11862.

64. Dolatshahi-Pirouz, A.; Jensen, T.; Kraft, D. C.; Foss, M.; Kingshott, P.; Hansen, J. L.; Larsen, A. N.; Chevallier, J.; Besenbacher, F., Fibronectin Adsorption, Cell Adhesion, and Proliferation on Nanostructured Tantalum Surfaces. *ACS Nano* **2010**, *4* (5), 2874-2882.

65. (a) Lai, B. F. L.; Creagh, A. L.; Janzen, J.; Haynes, C. A.; Brooks, D. E.; Kizhakkedathu, J. N., The induction of thrombus generation on nanostructured neutral polymer brush surfaces. *Biomaterials* **2010**, *31* (26), 6710-6718; (b) Mizutani, A.; Kikuchi, A.; Yamato, M.; Kanazawa, H.; Okano, T., Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells. *Biomaterials* **2008**, *29* (13), 2073-2081.

66. Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M. T.; Trubetsky, V.; Torchilin, V.; Langer, R., Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* **1994**, *263* (5153), 1600-3.

67. Vittaz, M.; Bazile, D.; Spenlehauer, G.; Verrecchia, T.; Veillard, M.; Puisieux, F.; Labarre, D., Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials* **1996**, *17* (16), 1575-81.

68. Sahli, H.; Tapon-Brethaudiere, J.; Fischer, A. M.; Sternberg, C.; Spenlehauer, G.; Verrecchia, T.; Labarre, D., Interactions of poly(lactic acid) and poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles with the plasma factors of the coagulation system. *Biomaterials* **1997**, *18* (4), 281-8.

69. Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K. A., Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (38), 14265-14270.

70. Ogawara, K.-i.; Furumoto, K.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Higaki, K.; Kimura, T., Surface hydrophobicity of particles is not necessarily the most important determinant in their in vivo disposition after intravenous administration in rats. *Journal of Controlled Release* **2001**, *77* (3), 191-198.

71. Nagayama, S.; Ogawara, K.-i.; Minato, K.; Fukuoka, Y.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Higaki, K.; Kimura, T., Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *329* (1-2), 192-198.

72. Dutta, D.; Sundaram, S. K.; Teegarden, J. G.; Riley, B. J.; Fifield, L. S.; Jacobs, J. M.; Addleman, S. R.; Kaysen, G. A.; Moudgil, B. M.; Weber, T. J., Adsorbed Proteins Influence the Biological Activity and Molecular Targeting of Nanomaterials. *Toxicological Sciences* **2007**, *100* (1), 303-315.

73. Verrecchia, C.; Boulu, R. G.; Plotkine, M., Neuroprotective and deleterious effects of nitric oxide on focal cerebral ischemia-induced neurone death. *Adv Neuroimmunol* **1995**, *5* (4), 359-78.
74. Labarre, D.; Vauthier, C.; Chauvierre, C.; Petri, B.; Muller, R.; Chehimi, M. M., Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush. *Biomaterials* **2005**, *26* (24), 5075-84.
75. Yang, Y.; Cavin, R.; Ong, J. L., Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003**, *67A*, 344-349.
76. (a) SCCP/1147/07 *Opinion on safety of nanomaterials in cosmetic products*; Directorate-General for Health & Consumers, European Commission: 2007; (b) Stern, S. T.; McNeil, S. E., Nanotechnology Safety Concerns Revisited. *Toxicological Sciences* **2008**, *101* (1), 4-21.
77. Sadrieh, N.; Wokovich, A. M.; Gopee, N. V.; Zheng, J.; Haines, D.; Parmiter, D.; Siitonen, P. H.; Cozart, C. R.; Patri, A. K.; McNeil, S. E.; Howard, P. C.; Doub, W. H.; Buhse, L. F., Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide (TiO₂) from Sunscreen Formulations containing Nano- and Sub-Micron-Size TiO₂ Particles. *Toxicological Sciences* **2010**.
78. Vlachou, E.; Chipp, E.; Shale, E.; Wilson, Y. T.; Papini, R.; Moiemmen, N. S., The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: A study of systemic silver absorption. *Burns* **2007**, *33* (8), 979-985.
79. (a) Rouse, J. G.; Yang, J.; Ryman-Rasmussen, J. P.; Barron, A. R.; Monteiro-Riviere, N. A., Effects of Mechanical Flexion on the Penetration of Fullerene Amino Acid-Derivatized Peptide Nanoparticles through Skin. *Nano Letters* **2007**, *7* (1), 155-160; (b) Ryman-Rasmussen, J. P.; Riviere, J. E.; Monteiro-Riviere, N. A., Penetration of Intact Skin by Quantum Dots with Diverse Physicochemical Properties. *Toxicological Sciences* **2006**, *91* (1), 159-165; (c) Wu, J.; Liu, W.; Xue, C.; Zhou, S.; Lan, F.; Bi, L.; Xu, H.; Yang, X.; Zeng, F.-D., Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology Letters* **2009**, *191* (1), 1-8.
80. Tinkle, S. S.; Antonini, J. M.; Rich, B. A.; Roberts, J. R.; Salmen, R.; DePree, K.; Adkins, E. J., Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* **2003**, *111* (9), 1202-1208.
81. (a) Alvarez-Román, R.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H.; Fessi, H., Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2004**, *99* (1), 53-62; (b) Baroli, B.; Ennas, M. G.; Loffredo, F.; Isola, M.; Pinna, R.; Lopez-Quintela, M. A., Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *J Invest Dermatol* **2007**, *127* (7), 1701-1712.
82. Maynard, A.; Kuempel, E., Airborne Nanostructured Particles and Occupational Health. *Journal of Nanoparticle Research* **2005**, *7* (6), 587-614.
83. Muller, J.; Huaux, F.; Moreau, N.; Misson, P.; Heillier, J.-F.; Delos, M.; Arras, M.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Lison, D., Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2005**, *207* (3), 221-231.
84. Geiser, M.; Kreyling, W. G., Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* **2010**, *7*, 2.
85. Semmler-Behnke, M.; Takenaka, S.; Fertsch, S.; Wenk, A.; Seitz, J.; Mayer, P.; Oberdorster, G.; Kreyling, W. G., Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium. *Environ Health Perspect* **2007**, *115* (5), 728-33.
86. Shvedova, A. A.; Kagan, V. E., The role of nanotoxicology in realizing the 'helping without harm' paradigm of nanomedicine: lessons from studies of pulmonary effects of single-walled carbon nanotubes. *J Intern Med* **2010**, *267* (1), 106-18.
87. Hagens, W. I.; Oomen, A. G.; de Jong, W. H.; Cassee, F. R.; Sips, A. J. A. M., What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2007**, *49* (3), 217-229.
88. Hillyer, J. F.; Albrecht, R. M., Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, *90*, 1927-1936.
89. Hoet, P.; Bruske-Hohlfeld, I.; Salata, O., Nanoparticles - known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology* **2004**, *2* (1), 12.
90. Reijnders, L., The release of TiO₂ and SiO₂ nanoparticles from nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability* **2009**, *94* (5), 873-876.
91. Ballestri, M.; Baraldi, A.; Gatti, A. M.; Furci, L.; Bagni, A.; Loria, P.; Rapanà, R. M.; Carulli, N.; Albertazzi, A., Liver and Kidney Foreign Bodies Granulomatosis in a Patient With Malocclusion, Bruxism, and Worn Dental Prostheses. *Gastroenterology* **2001**, *121* (5), 1234-1238.

92. De Jong, W. H.; Hagens, W. I.; Krystek, P.; Burger, M. C.; Sips, A. J. A. M.; Geertsma, R. E., Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* **2008**, *29* (12), 1912-1919.
93. Åkerman, M. E.; Chan, W. C. W.; Laakkonen, P.; Bhatia, S. N.; Ruoslahti, E., Nanocrystal targeting in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99* (20), 12617-12621.
94. Niidome, T.; Yamagata, M.; Okamoto, Y.; Akiyama, Y.; Takahashi, H.; Kawano, T.; Katayama, Y.; Niidome, Y., PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *Journal of Controlled Release* **2006**, *114* (3), 343-347.
95. Sarlo, K.; Blackburn, K. L.; Clark, E. D.; Grothaus, J.; Chaney, J.; Neu, S.; Flood, J.; Abbott, D.; Bohne, C.; Casey, K.; Fryer, C.; Kuhn, M., Tissue distribution of 20 nm, 100 nm and 1000 nm fluorescent polystyrene latex nanospheres following acute systemic or acute and repeat airway exposure in the rat. *Toxicology* **2009**, *263* (2-3), 117-126.
96. Singh, R.; Pantarotto, D.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Klumpp, C.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K., Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (9), 3357-3362.
97. (a) Furumoto, K.; Ogawara, K.-i.; Yoshida, M.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Higaki, K.; Kimura, T., Biliary excretion of polystyrene microspheres depends on the type of receptor-mediated uptake in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2001**, *1526* (2), 221-226; (b) Ogawara, K.-i.; Yoshida, M.; Higaki, K.; Toshihiro, K.; Shiraiishi, K.; Nishikawa, M.; Takakura, Y.; Hashida, M., Hepatic uptake of polystyrene microspheres in rats: Effect of particle size on intrahepatic distribution. *Journal of Controlled Release* **1999**, *59* (1), 15-22.
98. Aillon, K. L.; Xie, Y.; El-Gendy, N.; Berkland, C. J.; Forrest, M. L., Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61* (6), 457-466.
99. Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R., Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* **2008**, *4*, 26-49.
100. Singh, S.; Shi, T.; Duffin, R.; Albrecht, C.; van Berlo, D.; Höhr, D.; Fubini, B.; Martra, G.; Fenoglio, I.; Borm, P. J. A.; Schins, R. P. F., Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2007**, *222* (2), 141-151.
101. Geiser, M.; Rothen-Rutishauser, B.; Kapp, N.; Schürch, S.; Kreyling, W.; Schulz, H.; Semmler, M.; Im Hof, V.; Heyder, J.; Gehr, P., Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environ Health Perspect.* **2005**, *113* (11), 1555-1560.
102. Limbach, L. K.; Li, Y.; Grass, R. N.; Brunner, T. J.; Hintermann, M. A.; Muller, M.; Gunther, D.; Stark, W. J., Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts: Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39* (23), 9370-9376.
103. Porter, A. E.; Muller, K.; Skepper, J.; Midgley, P.; Welland, M., Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: Studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomaterialia* **2006**, *2* (4), 409-419.
104. Yang, Z.; Liu, Z. W.; Allaker, R. P.; Reip, P.; Oxford, J.; Ahmad, Z.; Ren, G., A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *Journal of The Royal Society Interface* **2010**, *7* (Suppl 4), S411-S422.
105. Hussain, S.; Thomassen, L. C.; Ferecatu, I.; Borot, M. C.; Andreau, K.; Martens, J. A.; Fleury, J.; Baeza-Squiban, A.; Marano, F.; Boland, S., Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* **2010**, *7*, 10.
106. Li, H.; Haberzettl, P.; Albrecht, C.; Hohn, D.; Knaapen, A. M.; Borm, P. J.; Schins, R. P., Inhibition of the mitochondrial respiratory chain function abrogates quartz induced DNA damage in lung epithelial cells. *Mutat Res* **2007**, *617* (1-2), 46-57.
107. Sioutas, C.; Delfino, R. J.; Singh, M., Exposure Assessment for Atmospheric Ultrafine Particles (UFPs) and Implications in Epidemiologic Research. *Environmental Health Perspectives* **2005**, *113* (8), 947-955.
108. Worle-Knirsch, J.; Pulskamp, K.; Krug, H., Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Letters* **2006**, *6* (6), 1261-1268
109. Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Benoit, J.-P., Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* **2006**, *27* (24), 4356-4373.
110. Peracchia, M. T.; Vauthier, C.; Passirani, C.; Couvreur, P.; Labarre, D., Complement consumption by poly(ethylene glycol) in different conformations chemically coupled to poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. *Life Sci* **1997**, *61* (7), 749-61.

111. Bertholon, I.; Vauthier, C.; Labarre, D., Complement activation by core-shell poly(isobutylcyanoacrylate)-polysaccharide nanoparticles: influences of surface morphology, length, and type of polysaccharide. *Pharm Res* **2006**, *23* (6), 1313-23.
112. Ishida, T.; Wang, X.; Shimizu, T.; Nawata, K.; Kiwada, H., PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. *Journal of Controlled Release* **2007**, *122* (3), 349-355.
113. Wang, X.; Ishida, T.; Kiwada, H., Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. *Journal of Controlled Release* **2007**, *119* (2), 236-244.
114. (a) Zolnik, B. S.; Gonzalez-Fernandez, A.; Sadrieh, N.; Dobrovolskaia, M. A., Minireview: Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology* **2010**, *151* (2), 458-465; (b) Lucarelli, M.; Gatti, A. M.; Savarino, G.; Quattroni, P.; Martinelli, L.; Monari, E.; Boraschi, D., Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *European Cytokine Network* **2004**, *15* (4), 339-46.
115. Kim, W.-U.; Lee, W.-K.; Ryoo, J.-W.; Kim, S.-H.; Kim, J.; Youn, J.; Min, S.-Y.; Bae, E.-Y.; Hwang, S.-Y.; Park, S.-H.; Cho, C.-S.; Park, J.-S.; Kim, H.-Y., Suppression of collagen-induced arthritis by single administration of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles entrapping type II collagen: A novel treatment strategy for induction of oral tolerance. *Arthritis & Rheumatism* **2002**, *46*, 1109-1120.
116. Alessandrini, F.; Schulz, H.; Takenaka, S.; Lentner, B.; Karg, E.; Behrendt, H.; Jakob, T., Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2006**, *117* (4), 824-830.
117. Dykman, L. A.; Sumaroka, M. V.; Staroverov, S. A.; Zaitseva, I. S.; Bogatyrev, V. A., Immunogenic Properties of Colloidal Gold. *Biology Bulletin* **2004**, *31* (1), 75-79.
118. Andreev, S. M.; Babakhin, A. A.; Petrukhina, A. O.; Romanova, V. S.; Parnes, Z. N.; Petrov, R. V., Immunogenic and allergenic properties of fullerene conjugates with aminoacids and proteins. *Dokl Biochem* **2000**, *370*, 4-7.
119. Tan, Y.; Li, S.; Pitt, B. R.; Huang, L., The Inhibitory Role of CpG Immunostimulatory Motifs in Cationic Lipid Vector-Mediated Transgene Expression in Vivo. *Human Gene Therapy* **1999**, *10* (13), 2153-2161.
120. Rajanathanan, P.; Attard, G. S.; Sheikh, N. A.; Morrow, W. J. W., Evaluation of novel aggregate structures as adjuvants: composition, toxicity studies and humoral responses. *Vaccine* **1999**, *17* (7-8), 715-730.
121. Cho, W. S.; Duffin, R.; Poland, C. A.; Howie, S. E.; Macnee, W.; Bradley, M.; Megson, I. L.; K., D., Metal Oxide Nanoparticles Induce Unique Inflammatory Footprints in the Lung; Important Implications for Nanoparticle Testing. *Environ Health Perspect.* **2010**, in press.
122. Auffan, M.; Rose, J.; Bottero, J.-Y.; Lowry, G. V.; Jolivet, J.-P.; Wiesner, M. R., Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nano* **2009**, *4* (10), 634-641.
123. Chen, B. X.; Wilson, S. R.; Das, M.; Coughlin, D. J.; Erlanger, B. F., Antigenicity of fullerenes: Antibodies specific for fullerenes and their characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95* (18), 10809-10813.
124. Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Simard, P.; Leroux, J.; Benoit, J., Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006**, *78A*, 620-628.
125. Cuña, M.; Alonso-Sande, M.; Remuñán-López, C.; Pivel, J. P.; Alonso-Lebrero, J. L.; Alonso, M. J., Development of Phosphorylated Glucomannan-Coated Chitosan Nanoparticles as Nanocarriers for Protein Delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2006**, *6*, 2887-2895.
126. Champion, J. A.; Mitragotri, S., Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (13), 4930-4934.
127. Mitchell, L. A.; Lauer, F. T.; Burchiel, S. W.; McDonald, J. D., Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. *Nat Nano* **2009**, *4* (7), 451-456.
128. Wegmann, K. W.; Wagner, C. R.; Whitham, R. H.; Hinrichs, D. J., Synthetic Peptide Dendrimers Block the Development and Expression of Experimental Allergic Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **2008**, *181* (5), 3301-3309.
129. Midander, K.; Pan, J.; Wallinder, I. O.; Heim, K.; Leygraf, C., Nickel release from nickel particles in artificial sweat. *Contact Dermatitis* **2007**, *56*, 325-330.
130. Rothenberg, M. E., Innate sensing of nickel. *Nat Immunol* **2010**, *11* (9), 781-782.
131. Midander, K.; Cronholm, P.; Karlsson, H. L.; Elihn, K.; Möller, L.; Leygraf, C.; Wallinder, I. O., Surface Characteristics, Copper Release, and Toxicity of Nano- and Micrometer-Sized Copper and Copper(II) Oxide Particles: A Cross-Disciplinary Study. *Small* **2009**, *5*, 389-399.

132. Huczko, A.; Lange, H., Carbon nanotubes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* **2001**, *9* (2), 247 - 250.
133. Kishore, A. S.; Surekha, P.; Murthy, P. B., Assessment of the dermal and ocular irritation potential of multi-walled carbon nanotubes by using in vitro and in vivo methods. *Toxicology Letters* **2009**, *191* (2-3), 268-274.
134. Eedy, D. J., Carbon-fibre-induced airborne irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* **1996**, *35*, 362-363.
135. Radomski, A.; Jurasz, P.; Alonso-Escolano, D.; Drews, M.; Morandi, M.; Malinski, T.; Radomski, M. W., Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis *British Journal of Pharmacology* **2005**, *146*, 882-893.
136. Mayer, A.; Vadon, M.; Rinner, B.; Novak, A.; Wintersteiger, R.; Fröhlich, E., The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology* **2009**, *258* (2-3), 139-147.
137. Rothen-Rutishauser, B. M.; Schürch, S.; Haenni, B.; Kapp, N.; Gehr, P., Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (14), 4353-4359.
138. (a) Koziara, J.; Oh, J.; Akers, W.; Ferraris, S.; Mumper, R., Blood Compatibility of Cetyl Alcohol/Polysorbate-Based Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* **2005**, *22* (11), 1821-1828; (b) Oyewumi, M. O.; Yokel, R. A.; Jay, M.; Coakley, T.; Mumper, R. J., Comparison of cell uptake, biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release* **2004**, *95* (3), 613-626.
139. Mills, N. L.; Donaldson, K.; Hadoke, P. W.; Boon, N. A.; MacNee, W.; Cassee, F. R.; Sandstrom, T.; Blomberg, A.; Newby, D. E., Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **2009**, *6* (1), 36-44.
140. Wang, J.; Zhou, G.; Chen, C.; Yu, H.; Wang, T.; Ma, Y.; Jia, G.; Gao, Y.; Li, B.; Sun, J.; Li, Y.; Jiao, F.; Zhao, Y.; Chai, Z., Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters* **2007**, *168* (2), 176-185.
141. Chen, H. H. C.; Yu, C.; Ueng, T. H.; Chen, S.; Chen, B. J.; Huang, K. J.; Chiang, L. Y., Acute and Subacute Toxicity Study of Water-Soluble Polyalkylsulfonated C60 in Rats. *Toxicologic Pathology* **1998**, *26* (1), 143-151.
142. Seleverstov, O.; Zabirnyk, O.; Zscharnack, M.; Bulavina, L.; Nowicki, M.; Heinrich, J.-M.; Yezhelyev, M.; Emmrich, F.; O'Regan, R.; Bader, A., Quantum Dots for Human Mesenchymal Stem Cells Labeling. A Size-Dependent Autophagy Activation. *Nano Letters* **2006**, *6* (12), 2826-2832.
143. Geys, J.; Nemmar, A.; Verbeken, E.; Smolders, E.; Ratoi, M.; Hoylaerts, M. F.; Nemery, B.; Hoet, P. H. M., Acute Toxicity and Prothrombotic Effects of Quantum Dots: Impact of Surface Charge. *Environmental Health Perspectives* **2008**, *116* (12).
144. (a) Pante, N.; Kann, M., Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm. *Molecular Biology of the Cell* **2002**, *13* (2), 425-434; (b) Nabiev, I.; Mitchell, S.; Davies, A.; Williams, Y.; Kelleher, D.; Moore, R.; Gun'ko, Y. K.; Byrne, S.; Rakovich, Y. P.; Donegan, J. F.; Sukhanova, A.; Conroy, J.; Cottell, D.; Gaponik, N.; Rogach, A.; Volkov, Y., Nonfunctionalized Nanocrystals Can Exploit a Cell's Active Transport Machinery Delivering Them to Specific Nuclear and Cytoplasmic Compartments. *Nano Letters* **2007**, *7* (11), 3452-3461.
145. (a) Bhabra, G.; Sood, A.; Fisher, B.; Cartwright, L.; Saunders, M.; Evans, W. H.; Surprenant, A.; Lopez-Castejon, G.; Mann, S.; Davis, S. A.; Hails, L. A.; Ingham, E.; Verkade, P.; Lane, J.; Heesom, K.; Newson, R.; Case, C. P., Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. *Nat Nano* **2009**, *4* (12), 876-883; (b) Parry, M. C.; Bhabra, G.; Sood, A.; Machado, F.; Cartwright, L.; Saunders, M.; Ingham, E.; Newson, R.; Blom, A. W.; Case, C. P., Thresholds for indirect DNA damage across cellular barriers for orthopaedic biomaterials. *Biomaterials* **2010**, *31* (16), 4477-4483.
146. Chen, M.; von Mikecz, A., Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Experimental Cell Research* **2005**, *305* (1), 51-62.
147. Ahamed, M.; Karns, M.; Goodson, M.; Rowe, J.; Hussain, S. M.; Schlager, J. J.; Hong, Y., DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2008**, *233* (3), 404-410.
148. AshaRani, P. V.; Mun, G. L. K.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S., Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009**, *3* (2), 279-290.
149. Singh, N.; Manshian, B.; Jenkins, G. J. S.; Griffiths, S. M.; Williams, P. M.; Maffei, T. G. G.; Wright, C. J.; Doak, S. H., NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* **2009**, *30* (23-24), 3891-3914.

150. Landsiedel, R.; Kapp, M. D.; Schulz, M.; Wiench, K.; Oesch, F., Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--Many questions, some answers. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2009**, *681* (2-3), 241-258.
151. Papageorgiou, I.; Brown, C.; Schins, R.; Singh, S.; Newson, R.; Davis, S.; Fisher, J.; Ingham, E.; Case, C. P., The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials* **2007**, *28* (19), 2946-2958.
152. (a) Gungor, N.; Godschalk, R. W.; Pachen, D. M.; Van Schooten, F. J.; Knaapen, A. M., Activated neutrophils inhibit nucleotide excision repair in human pulmonary epithelial cells: role of myeloperoxidase. *FASEB J* **2007**, *21* (10), 2359-67; (b) Knaapen, A. M.; Gungor, N.; Schins, R. P.; Borm, P. J.; Van Schooten, F. J., Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis* **2006**, *21* (4), 225-36.
153. Gonzalez, L.; Lison, D.; Kirsch-Volders, M., Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology* **2008**, *2* (4), 252-273.
154. Colognato, R.; Bonelli, A.; Ponti, J.; Farina, M.; Bergamaschi, E.; Sabbioni, E.; Migliore, L., Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes in vitro. *Mutagenesis* **2008**, *23* (5), 377-382.
155. Gatti, A.; Kirkpatrick, J.; Gambarelli, A.; Capitani, F.; Hansen, T.; Eloy, R.; Clermont, G., ESEM evaluations of muscle/nanoparticles interface in a rat model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2008**, *19* (4), 1515-1522.
156. Sanchez, V. C.; Pietruska, J. R.; Miselis, N. R.; Hurt, R. H.; Kane, A. B., Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials: what have we learned from asbestos? *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* **2009**, *1* (5), 511-529.
157. (a) Poland, C. A.; Duffin, R.; Kinloch, I.; Maynard, A.; Wallace, W. A. H.; Seaton, A.; Stone, V.; Brown, S.; MacNee, W.; Donaldson, K., Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nano* **2008**, *3* (7), 423-428; (b) Takagi, A.; Hirose, A.; Nishimura, T.; Fukumori, N.; Ogata, A.; Ohashi, N.; Kitajima, S.; Kanno, J., Induction of mesothelioma in p53^{+/-} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *Journal of Toxicological Sciences* **2008**, *33* (1), 105-116; (c) Sakamoto, Y.; Nakae, D.; Fukumori, N.; Tayama, K.; Maekawa, A.; Imai, K.; Hirose, A.; Nishimura, T.; Ohashi, N.; Ogata, A., Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.* **2009**, *34* (1), 65-76.
158. Muller, J.; Delos, M.; Panin, N.; Rabolli, V.; Huaux, F.; Lison, D., Absence of Carcinogenic Response to Multiwall Carbon Nanotubes in a 2-Year Bioassay in the Peritoneal Cavity of the Rat. *Toxicological Sciences* **2009**, *110* (2), 442-448.
159. Borm, P. J. A.; Kreyling, W., Toxicological Hazards of Inhaled Nanoparticles-Potential Implications for Drug Delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2004**, *4*, 521-531.
160. Ema, M.; Kobayashi, N.; Naya, M.; Hanai, S.; Nakanishi, J., Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reproductive Toxicology* **2010**, *30* (3), 343-352.
161. Takahashi, S.; O., M., Cross placental transfer of 198Au-colloid in near term rats. *J Radiat Res* **1981**, *22* (2), 242-249.
162. Challier, J.; Panigel, M.; Meyer, E., Uptake of colloidal 198Au by fetal liver in rat, after direct intrafetal administration. *Int J Nucl Med Biol.* **1973**, *1* (2), 103-6.
163. Sadauskas, E.; Wallin, H.; Stoltenberg, M.; Vogel, U.; Doering, P.; Larsen, A.; Danscher, G., Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Particle and Fibre Toxicology* **2007**, *4* (1), 10.
164. Wick, P.; Malek, A.; Manser, P.; Meili, D.; Maeder-Althaus, X.; Diener, L.; Diener, P.-A.; Zisch, A.; Krug, H. F.; von Mandach, U., Barrier Capacity of Human Placenta for Nanosized Materials. *Environmental Health Perspectives* **2010**, *118* (3).
165. Chu, M.; Wu, Q.; Yang, H.; Yuan, R.; Hou, S.; Yang, Y.; Zou, Y.; Xu, S.; Xu, K.; Ji, A.; Sheng, L., Transfer of Quantum Dots from Pregnant Mice to Pups Across the Placental Barrier *Small* **2010**, *6* (5), 670 - 678.
166. (a) Shimizu, M.; Tainaka, H.; Oba, T.; Mizuo, K.; Umezawa, M.; Takeda, K., Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Particle and Fibre Toxicology* **2009**, *6* (1), 20; (b) Takeda, K.; Suzuki, K.-i.; Ishihara, A.; Kubo-Irie, M.; Fujimoto, R.; Tabata, M.; Oshio, S.; Nihei, Y.; Ihara, T.; Sugamata, M., Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems. *J. Health Sci.* **2009**, *55*, 95-102.
167. Bai, Y.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Mu, Q.; Zhang, W.; Butch, E. R.; Snyder, S. E.; Yan, B., Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. *Nat Nano* **2010**, *5* (9), 683-689.
168. Hu, Y.-L.; Gao, J.-Q., Potential neurotoxicity of nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *394* (1-2), 115-121.

169. Sharma, H. S.; Sharma, A., Nanoparticles aggravate heat stress induced cognitive deficits, blood-brain barrier disruption, edema formation and brain pathology. In *Progress in Brain Research*, Hari Shanker, S., Ed. Elsevier: 2007; Vol. Volume 162, pp 245-273.
170. Sonavane, G.; Tomoda, K.; Makino, K., Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008**, *66* (2), 274-280.
171. Sharma, H. S.; Ali, S. F.; Hussain, S. M.; Schlager, J. J.; Sharma, A., Influence of Engineered Nanoparticles from Metals on the Blood-Brain Barrier Permeability, Cerebral Blood Flow, Brain Edema and Neurotoxicity. An Experimental Study in the Rat and Mice Using Biochemical and Morphological Approaches. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, *9*, 5055-5072.
172. Elder, A.; Gelein, R.; Silva, V.; Feikert, T.; Opanashuk, L.; Carter, J.; Potter, R.; Maynard, A.; Ito, Y.; Finkelstein, J. N.; Oberdorster, E., Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* **2006**, *114*, 1172-1178.
173. (a) Silva, G., Nanotechnology approaches to crossing the blood-brain barrier and drug delivery to the CNS. *BMC Neuroscience* **2008**, *9* (Suppl 3), S4; (b) Silva, G. A., Nanotechnology approaches for drug and small molecule delivery across the blood brain barrier. *Surgical Neurology* **2007**, *67* (2), 113-116; (c) Roney, C.; Kulkarni, P.; Arora, V.; Antich, P.; Bonte, F.; Wu, A.; Mallikarjuna, N. N.; Manohar, S.; Liang, H.-F.; Kulkarni, A. R.; Sung, H.-W.; Sairam, M.; Aminabhavi, T. M., Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release* **2005**, *108* (2-3), 193-214.
174. Pantarotto, D.; Partidos, C. D.; Hoebeke, J.; Brown, F.; Kramer, E.; Briand, J.-P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A., Immunization with Peptide-Functionalized Carbon Nanotubes Enhances Virus-Specific Neutralizing Antibody Responses. *Chemistry & Biology* **2003**, *10* (10), 961-966.
175. (a) Firme III, C. P.; Bandaru, P. R., Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, *6* (2), 245-256; (b) Muller, J.; Huaux, F.; Lison, D., Respiratory toxicity of carbon nanotubes: How worried should we be? *Carbon* **2006**, *44* (6), 1048-1056; (c) Shvedova, A. A.; Kisin, E. R.; Porter, D.; Schulte, P.; Kagan, V. E.; Fadeel, B.; Castranova, V., Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? *Pharmacology & Therapeutics* **2009**, *121* (2), 192-204.
176. Shvedova, A. A.; Kisin, E.; Murray, A. R.; Johnson, V. J.; Gorelik, O.; Arepalli, S.; Hubbs, A. F.; Mercer, R. R.; Keohavong, P.; Sussman, N.; Jin, J.; Yin, J.; Stone, S.; Chen, B. T.; Deye, G.; Maynard, A.; Castranova, V.; Baron, P. A.; Kagan, V. E., Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2008**, *295* (4), L552-65.
177. Radomski, A.; Jurasz, P.; Alonso-Escolano, D.; Drews, M.; Morandi, M.; Malinski, T.; Radomski, M. W., Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *British Journal of Pharmacology* **2005**, *146* (6), 882-893.
178. Porter, A. E.; Gass, M.; Muller, K.; Skepper, J. N.; Midgley, P. A.; Welland, M., Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nat Nano* **2007**, *2* (11), 713-717.
179. Lindberg, H. K.; Falck, G. C. M.; Suhonen, S.; Vippola, M.; Vanhala, E.; Catalán, J.; Savolainen, K.; Norppa, H., Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicology Letters* **2009**, *186* (3), 166-173.
180. Pauluhn, J., Multi-walled carbon nanotubes (Baytubes®): Approach for derivation of occupational exposure limit. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2010**, *57* (1), 78-89.
181. Kobayashi, N.; Naya, M.; Ema, M.; Endoh, S.; Maru, J.; Mizuno, K.; Nakanishi, J., Biological response and morphological assessment of individually dispersed multi-wall carbon nanotubes in the lung after intratracheal instillation in rats. *Toxicology* **2010**, *276* (3), 143-153.
182. Grabinski, C.; Hussain, S.; Lafdi, K.; Braydich-Stolle, L.; Schlager, J., Effect of particle dimension on biocompatibility of carbon nanomaterials. *Carbon* **2007**, *45* (14), 2828-2835.
183. Mutlu, G. M.; Budinger, G. R. S.; Green, A. A.; Urich, D.; Soberanes, S.; Chiarella, S. E.; Alheid, G. F.; McCrimmon, D. R.; Szeleifer, I.; Hersam, M. C., Biocompatible Nanoscale Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes Minimizes in vivo Pulmonary Toxicity. *Nano Letters* **2010**, *10* (5), 1664-1670.
184. Kostarelos, K., The long and short of carbon nanotube toxicity. *Nat Biotech* **2008**, *26* (7), 774-776.
185. Herzog, E.; Casey, A.; Lyng, F. M.; Chambers, G.; Byrne, H. J.; Davoren, M., A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials--The clonogenic assay. *Toxicology Letters* **2007**, *174* (1-3), 49-60.
186. Kagan, V. E.; Tyurina, Y. Y.; Tyurin, V. A.; Konduru, N. V.; Potapovich, A. I.; Osipov, A. N.; Kisin, E. R.; Schwegler-Berry, D.; Mercer, R.; Castranova, V.; Shvedova, A. A., Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicology Letters* **2006**, *165* (1), 88-100.

187. (a) Fenoglio, I.; Greco, G.; Tomatis, M.; Muller, J.; Raymundo-Piero, E.; Béguin, F.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Lison, D.; Fubini, B., Structural Defects Play a Major Role in the Acute Lung Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes: Physicochemical Aspects. *Chemical Research in Toxicology* **2008**, *21* (9), 1690-1697; (b) Muller, J.; Huaux, F.; Fonseca, A.; Fenoglio, I.; Nagy, J. B.; Moreau, N.; Delos, M.; Raymundo-Piero, E.; Béguin, F.; Kirsch-Volders, M.; Fenoglio, I.; Fubini, B.; Lison, D., Structural Defects Play a Major Role in the Acute Lung Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes: Physicochemical Aspects. *Chemical Research in Toxicology* **2008**, *21* (9), 1698-1705
188. Haut Conseil de la santé publique, Avis relatif à la sécurité des travailleurs lors de l'exposition aux nanotubes de carbone. 2009.
189. Cherukuri, P.; Gannon, C. J.; Leeuw, T. K.; Schmidt, H. K.; Smalley, R. E.; Curley, S. A.; Weisman, R. B., Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (50), 18882-18886.
190. Silvano, G.; et al., Carbon nanotube biocompatibility with cardiac muscle cells. *Nanotechnology* **2006**, *17* (2), 391.
191. Chlopek, J.; Czajkowska, B.; Szaraniec, B.; Frackowiak, E.; Szostak, K.; Béguin, F., In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon* **2006**, *44* (6), 1106-1111.
192. Gaffet, E. In *Propriétés et usages du nano-argent*, Analyse bénéfiques/risques appliquée aux nanotechnologies: l'exemple du nano-argent, Paris, Dab, W., Ed. Conservatoire National des Arts et Métiers: Paris, 2009; pp 3-17.
193. (a) Miura, N.; Shinohara, Y., Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, *390* (3), 733-737; (b) Drake, P. L.; Hazelwood, K. J., Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. *Annals of Occupational Hygiene* **2005**, *49* (7), 575-585.
194. (a) Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramírez, J. T.; Yacaman, M. J., The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16* (10), 2346; (b) Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M., Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73* (6), 1712-1720.
195. Nadworny, P. L.; Wang, J.; Tredget, E. E.; Burrell, R. E., Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2008**, *4* (3), 241-251.
196. Chen, X.; Schluesener, H. J., Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* **2008**, *176* (1), 1-12.
197. Cha, K.; Hong, H.-W.; Choi, Y.-G.; Lee, M.; Park, J.; Chae, H.-K.; Ryu, G.; Myung, H., Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnology Letters* **2008**, *30* (11), 1893-1899-1899.
198. Trop, M.; Novak, M.; Rodl, S.; Hellbom, B.; Kroell, W.; Goessler, W., Silver-Coated Dressing Acticoat Caused Raised Liver Enzymes and Argyria-like Symptoms in Burn Patient. *The Journal of Trauma* **2006**, *60* (3), 648-652 10.1097/01.ta.0000208126.22089.b6.
199. Asz, J.; Asz, D.; Moushey, R.; Seigel, J.; Mallory, S. B.; Foglia, R. P., Treatment of toxic epidermal necrolysis in a pediatric patient with a nanocrystalline silver dressing. *Journal of Pediatric Surgery* **2006**, *41* (12), e9-e12.
200. (a) Lam, P. K.; Chan, E. S. Y.; Ho, W. S.; Liew, C. T., In vitro cytotoxicity testing of a nanocrystalline silver dressing (Acticoat) on cultured keratinocytes. *British journal of biomedical science* **2004**, *61* (3), 125-127; (b) Poon, V. K. M.; Burd, A., In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns* **2004**, *30* (2), 140-147.
201. Stevens, K. N. J.; Crespo-Biel, O.; van den Bosch, E. E. M.; Dias, A. A.; Knetsch, M. L. W.; Aldenhoff, Y. B. J.; van der Veen, F. H.; Maessen, J. G.; Stobberingh, E. E.; Koole, L. H., The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. *Biomaterials* **2009**, *30* (22), 3682-3690.
202. (a) Schaff, H. V.; Carrel, T. P.; Jamieson, W. R. E.; Jones, K. W.; Rufilanchas, J. J.; Cooley, D. A.; Hetzer, R.; Stumpe, F.; Duveau, D.; Moseley, P.; van Boven, W. J.; Grunkemeier, G. L.; Kennard, E. D.; Holubkov, R., Paravalvular leak and other events in silzone-coated mechanical heart valves: a report from AVERT. *The Annals of Thoracic Surgery* **2002**, *73* (3), 785-792; (b) Englberger, L.; Schaff, H. V.; Jamieson, W. R. E.; Kennard, E. D.; Im, K. A.; Holubkov, R.; Carrel, T. P., Importance of implant technique on risk of major paravalvular leak (PVL) after St. Jude mechanical heart valve replacement: a report from the Artificial Valve Endocarditis Reduction Trial (AVERT). *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **2005**, *28* (6), 838-843; (c)

- Grunkemeier, G. L.; Jin, R.; Im, K.; Holubkov, R.; Kennard, E. D.; Schaff, H. V., Time-related risk of the St. Jude Silzone heart valve. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **2006**, *30* (1), 20-27.
203. Shanbhag, A. S.; Rubash, H. E., Wear: The Basis of Particle Disease in Total Hip Arthroplasty. *Techniques in Orthopaedics* **1993**, *8* (4), 269-274.
204. Doorn, P. F.; Campbell, P. A.; Worrall, J.; Benya, P. D.; McKellop, H. A.; Amstutz, H. C., Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: Transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, *42*, 103-111.
205. Büscher, R.; Täger, G.; Dudzinski, W.; Gleising, B.; Wimmer, M.; Fischer, A., Subsurface microstructure of metal-on-metal hip joints and its relationship to wear particle generation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2005**, *72B*, 206-214.
206. Revell, P. A., The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses. *Journal of The Royal Society Interface* **2008**, *5* (28), 1263-1278.
207. Case, C. P.; Langkamer, V. G.; James, C.; Palmer, M. R.; Kemp, A. J.; Heap, P. F.; Solomon, L., Widespread dissemination of metal debris from implants. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume* **1994**, *76-B* (5), 701-712.
208. Billi, F.; Campbell, P., Nanotoxicology of metal wear particles in total joint arthroplasty: a review of current concepts. *J Appl Biomater Biomech.* **2010**, *8* (1), 1-6.
209. Case, P., Accumulation of wear debris in the human body. In *Metasul : a metal-on-metal bearing*, Rieker, C.; Windler, M.; Wyss, U., Eds. Hans Huber: 1999.
210. De Boeck, M.; Kirsch-Volders, M.; Lison, D., Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2003**, *533* (1-2), 135-152.
211. (a) IARC, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol.52: Chlorinated drinking-water; chlorination by-products; some other halogenated compounds; cobalt and cobalt compounds. In *volume 52*, World Health Organization, Ed. Lyon, 1991; (b) IARC, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol.86: Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide. In *volume 86*, World Health Organization, Ed. Lyon, 2006.
212. (a) Baan, R.; Straif, K.; Grosse, Y.; Secretan, B.; El Ghissassi, F.; Coglianò, V., Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *The Lancet Oncology* **2006**, *7* (4), 295-296; (b) IARC, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol.93: Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. In *volume 93*, World Health Organization, Ed. Lyon, 2010.
213. Hussain, S.; Boland, S.; Baeza-Squiban, A.; Hamel, R.; Thomassen, L. C.; Martens, J. A.; Billon-Galland, M. A.; Fleury-Feith, J.; Moisan, F.; Pairon, J. C.; Marano, F., Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology* **2009**, *260* (1-3), 142-9.
214. Sayes, C. M.; Wahi, R.; Kurian, P. A.; Liu, Y.; West, J. L.; Ausman, K. D.; Warheit, D. B.; Colvin, V. L., Correlating Nanoscale Titania Structure with Toxicity: A Cytotoxicity and Inflammatory Response Study with Human Dermal Fibroblasts and Human Lung Epithelial Cells. *Toxicological Sciences* **2006**, *92* (1), 174-185.
215. Braydich-Stolle, L.; Schaeublin, N.; Murdock, R.; Jiang, J.; Biswas, P.; Schlager, J.; Hussain, S., Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanoparticles; nanotoxicity. *Journal of Nanoparticle Research* **2009**, *11* (6), 1361-1374.
216. (a) SCENHIR *Scientific Basis for the definition of the term "nanomaterial"*; Directorate-General for Health & Consumers, European Commission: 2010; (b) Montes-Burgos, I.; Walczyk, D.; Hole, P.; Smith, J.; Lynch, I.; Dawson, K., Characterisation of nanoparticle size and state prior to nanotoxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* **2010**, *12* (1), 47-53; (c) Murdock, R. C.; Braydich-Stolle, L.; Schrand, A. M.; Schlager, J. J.; Hussain, S. M., Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicological Sciences* **2008**, *101* (2), 239-253; (d) Powers, K. W.; Brown, S. C.; Krishna, V. B.; Wasdo, S. C.; Moudgil, B. M.; Roberts, S. M., Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. *Toxicol. Sci.* **2006**, *90* (2), 296-303; (e) Warheit, D. B., How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization? *Toxicological Sciences* **2008**, *101* (2), 183-185.
217. Chen, J.; Zhou, H.; Santulli, A. C.; Wong, S. S., Evaluating Cytotoxicity and Cellular Uptake from the Presence of Various Processed TiO₂ Nanostructured Morphologies. *Chemical Research in Toxicology* **2010**, *23* (5), 871-879.
218. Domingos, R. F.; Baalousha, M. A.; Ju-Nam, Y.; Reid, M. M.; Tufenkji, N.; Lead, J. R.; Leppard, G. G.; Wilkinson, K. J., Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes

219. Co-Nanomet Workgroup *Nanometrology Discussion Papers 2010*; 2010.
220. Song, N. W.; Park, K. M.; Lee, I.-H.; Huh, H., Uncertainty estimation of nanoparticle size distribution from a finite number of data obtained by microscopic analysis. *Metrologia* **2009**, 46 (5), 480-488.
221. Park, H.; Grassian, V. H., Commercially manufactured engineered nanomaterials for environmental and health studies: Important insights provided by independent characterization. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2010**, 29, 715-721.
222. (a) Shvedova, A. A.; Kisin, E. R.; Mercer, R.; Murray, A. R.; Johnson, V. J.; Potapovich, A. I.; Tyurina, Y. Y.; Gorelik, O.; Arepalli, S.; Schwegler-Berry, D.; Hubbs, A. F.; Antonini, J.; Evans, D. E.; Ku, B.-K.; Ramsey, D.; Maynard, A.; Kagan, V. E.; Castranova, V.; Baron, P., Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* **2005**, 289 (5), L698-708; (b) Warheit, D. B.; Laurence, B. R.; Reed, K. L.; Roach, D. H.; Reynolds, G. A. M.; Webb, T. R., Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicological Sciences* **2004**, 77 (1), 117-125.
223. Mercer, R. R.; Scabilloni, J.; Wang, L.; Kisin, E.; Murray, A. R.; Schwegler-Berry, D.; Shvedova, A. A.; Castranova, V., Alteration of deposition pattern and pulmonary response as a result of improved dispersion of aspirated single-walled carbon nanotubes in a mouse model. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* **2008**, 294 (1), L87-97.
224. Wang, S.; Lu, W.; Tovmachenko, O.; Rai, U. S.; Yu, H.; Ray, P. C., Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. *Chemical Physics Letters* **2008**, 463 (1-3), 145-149.
225. Myojo, T.; Ogami, A.; Oyabu, T.; Morimoto, Y.; Hirohashi, M.; Murakami, M.; Nishi, K.; Kadoya, C.; Tanaka, I., Risk assessment of airborne fine particles and nanoparticles. *Advanced Powder Technology* **2010**, 21 (5), 507-512.
226. Brunner, T. J.; Wick, P.; Manser, P.; Spohn, P.; Grass, R. N.; Limbach, L. K.; Bruinink, A.; Stark, W. J., In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. *Environmental Science & Technology* **2006**, 40 (14), 4374-4381.
227. Waters, K. M.; Masiello, L. M.; Zangar, R. C.; Tarasevich, B. J.; Karin, N. J.; Quesenberry, R. D.; Bandyopadhyay, S.; Teegarden, J. G.; Pounds, J. G.; Thrall, B. D., Macrophage Responses to Silica Nanoparticles are Highly Conserved Across Particle Sizes. *Toxicological Sciences* **2009**, 107 (2), 553-569.
228. Jia, G.; Wang, H.; Yan, L.; Wang, X.; Pei, R.; Yan, T.; Zhao, Y.; Guo, X., Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene. *Environmental Science & Technology* **2005**, 39 (5), 1378-1383.
229. Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E., Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society* **1938**, 60 (2), 309-319.
230. (a) Burtscher, H., Physical characterization of particulate emissions from diesel engines: a review. *Journal of Aerosol Science* **2005**, 36 (7), 896-932; (b) Maynard, A. D., Estimating Aerosol Surface Area from Number and Mass Concentration Measurements. *Annals of Occupational Hygiene* **2003**, 47 (2), 123-144.
231. Inoue, K.-i.; Takano, H.; Yanagisawa, R.; Hirano, S.; Sakurai, M.; Shimada, A.; Yoshikawa, T., Effects of Airway Exposure to Nanoparticles on Lung Inflammation Induced by Bacterial Endotoxin in Mice. *Environ Health Perspect.* **2006**, 114 (9), 1325-1330.
232. Jakubek, L. M.; Marangoudakis, S.; Raingod, J.; Liuc, X.; Lipscombe, D.; Hurt, R. H., The inhibition of neuronal calcium ion channels by trace levels of yttrium released from carbon nanotubes. *Biomaterials* **2009**, 30 (31), 6351-6357.
233. Oberdörster, E., Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in brain of Juvenile Largemouth bass. *Environ Health Perspect* **2004**, 112 (10), 1058-1062.
234. Andrievsky, G.; Klochkov, V.; Derevyanchenko, L., Is the C60 Fullerene Molecule Toxic?! *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* **2005**, 13 (4), 363-376.
235. Zhu, S.; Oberdörster, E.; Haasch, M. L., Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, Daphnia and fathead minnow. *Marine Environmental Research* **2006**, 62 (Supplement 1), S5-S9.
236. (a) Alberola, A. P.; Rädler, J. O., The defined presentation of nanoparticles to cells and their surface controlled uptake. *Biomaterials* **2009**, 30 (22), 3766-3770; (b) Clift, M. J. D.; Rothen-Rutishauser, B.; Brown, D. M.; Duffin, R.; Donaldson, K.; Proudfoot, L.; Guy, K.; Stone, V., The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2008**, 232 (3), 418-427.

237. Akiyama, Y.; Mori, T.; Katayama, Y.; Niidome, T., The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release* **2009**, *139* (1), 81-84.
238. Ballou, B.; Lagerholm, C. B.; Ernst, L. A.; Bruchez, M. P.; Waggoner, A. S., Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15* (1), 79-86.
239. Derfus, A. M.; Chan, W. C. W.; Bhatia, S. N., Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Letters* **2004**, *4* (1), 11-18.
240. Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M., Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15* (4), 897-900
241. Dobrovolskaia, M. A.; Aggarwal, P.; Hall, J. B.; McNeil, S. E., Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, *5* (4), 487-495.
242. Hu, X.; Cook, S.; Wang, P.; Hwang, H.-m., In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Science of The Total Environment* **2009**, *407* (8), 3070-3072.
243. ISO, NF EN ISO 14971 : Dispositifs médicaux - Application de la gestion des risques aux dispositifs médicaux. 2009.
244. (a) ISO, NF EN ISO 10993-8 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Sélection et qualification des matériaux de référence utilisés pour les essais biologiques. 2001; (b) ISO, NF EN ISO 10993-2 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Exigences relatives à la protection des animaux. 2006; (c) ISO, ISO/TS 10993-19 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Caractérisations physicochimique, morphologique et topographique des matériaux. 2006; (d) ISO, ISO/TS 10993-20 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Principes et méthodes relatifs aux essais immunotoxicologiques des dispositifs médicaux. 2006; (e) ISO, NF EN ISO 10993-7 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Résidus de stérilisation à l'oxyde d'éthylène. 2008; (f) ISO, NF EN ISO 10993-3 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Essais concernant la génotoxicité, la cancérogénicité et la toxicité sur la reproduction. 2009; (g) ISO, NF EN ISO 10993-4 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Choix des essais concernant les interactions avec le sang. 2009; (h) ISO, NF EN ISO 10993-6 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Essais concernant les effets locaux après implantation. 2009; (i) ISO, NF EN ISO 10993-10 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Essais d'irritation et d'hypersensibilité retardée. 2009; (j) ISO, NF EN ISO 10993-11 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Essais de toxicité systémique. 2009; (k) ISO, NF EN ISO 10993-12 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - préparation des échantillons et matériaux de référence. 2009; (l) ISO, NF EN ISO 10993-13 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Identification et quantification de produits de dégradation de dispositifs médicaux à base de polymères. 2009; (m) ISO, NF EN ISO 10993-14 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Identification et quantification des produits de dégradation des céramiques. 2009; (n) ISO, NF EN ISO 10993-15 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Identification et quantification des produits de dégradation issus des métaux et alliages. 2009; (o) ISO, NF EN ISO 10993-16 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Conception des études toxicocinétiques des produits de dégradation et des substances relargables. 2009; (p) ISO, NF EN ISO 10993-17 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Etablissement des limites admissibles des substances relargables. 2009; (q) ISO, NF EN ISO 10993-18 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Caractérisation chimique des matériaux. 2009; (r) ISO, NF EN ISO 10993-1 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Evaluation et essais au sein d'un processus de gestion de risque. 2010; (s) ISO, NF EN ISO 10993-5 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Essais concernant la cytotoxicité *in vitro*. 2010; (t) ISO, NF EN ISO 10993-9 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Cadre pour l'identification et la quantification des produits potentiels de dégradation. 2010.
245. Salonen, E.; Lin, S.; Reid, M. L.; Allegood, M.; Wang, X.; Rao, A. M.; Vattulainen, I.; Ke, P. C., Real-Time Translocation of Fullerene Reveals Cell Contraction. *Small* **2008**, *4*, 1986-1992.
246. Sayes, C. M.; Reed, K. L.; Warheit, D. B., Assessing Toxicity of Fine and Nanoparticles: Comparing In Vitro Measurements to In Vivo Pulmonary Toxicity Profiles. *Toxicological Sciences* **2007**, *97* (1), 163-180.
247. Barrett, E. G.; Johnston, C.; Oberdörster, G.; Finkelstein, J. N., Silica Binds Serum Proteins Resulting in a Shift of the Dose-Response for Silica-Induced Chemokine Expression in an Alveolar Type II Cell Line. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1999**, *161* (2), 111-122.
248. Oberdörster, G., Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2000**, *358* (1775), 2719-2740.
249. Wittmaack, K., In Search of the Most Relevant Parameter for Quantifying Lung Inflammatory Response to Nanoparticle Exposure: Particle Number, Surface Area, or What? *Environ Health Perspect.* February **2007**, *115* (2), 187-194.
250. Teeguarden, J. G.; Hinderliter, P. M.; Orr, G.; Thrall, B. D.; Pounds, J. G., Particokinetics In Vitro: Dosimetry Considerations for In Vitro Nanoparticle Toxicity Assessments. *Toxicol. Sci.* **2007**, *95* (2), 300-312.

251. Lison, D.; Thomassen, L. C. J.; Rabolli, V.; Gonzalez, L.; Napierska, D.; Seo, J. W.; Kirsch-Volders, M.; Hoet, P.; Kirschhock, C. E. A.; Martens, J. A., Nominal and Effective Dosimetry of Silica Nanoparticles in Cytotoxicity Assays. *Toxicological Sciences* **2008**, *104* (1), 155-162.
252. Zolnik, B. S.; Sadrieh, N., Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61* (6), 422-427.
253. Afssaps, Recommandations relatives a l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire. 2008.
254. Monteiro-Riviere, N. A.; Inman, A. O.; Zhang, L. W., Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, *234* (2), 222-235.
255. OCDE, OECD guideline for testing of chemicals: Bacterial Reverse Mutation Test. In *471*, 1997.
256. Doak, S. H.; Griffiths, S. M.; Manshian, B.; Singh, N.; Williams, P. M.; Brown, A. P.; Jenkins, G. J. S., Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis* **2009**, *24* (4), 285-293.
257. Dombu, C. Y.; Kroubi, M.; Zibouche, R.; Matran, R.; Betbeder, D., Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology* **2010**, *21* (35), 355102.
258. Val, S.; Hussain, S.; Boland, S.; Hamel, R.; Baeza-Squiban, A.; Marano, F., Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. *Inhal Toxicol* **2009**, *21 Suppl 1*, 115-22.
259. Dobrovol'skaia, M.; Clogston, J.; Neun, B.; Hall, J.; Patri, A.; McNeil, S., Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Letters* **2008**, *8* (8), 2180-7.
260. Commission of the European Communities *Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee : Regulatory aspects of nanomaterials* Brussels, 2008.
261. OCDE, Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD Sponsorship Programme: First Revision. In *No. 25 - ENV/JM/MONO(2009)20/REV* OCDE, Ed. 2010.
262. OCDE, Preliminary Guidance Notes on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials. In *No. 24 - ENV/JM/MONO(2010)25* OCDE, Ed. 2010.

ANNEXE I : Extrait du *Bulletin Officiel Santé – Protection sociale – Solidarité* n°2010-11 du 15 décembre 2010

MINISTÈRE DU TRAVAIL, DE L'EMPLOI ET DE LA SANTÉ
MINISTÈRE DES SOLIDARITÉS ET DE LA COHÉSION SOCIALE

ADMINISTRATION

AUTORITÉS ADMINISTRATIVES INDÉPENDANTES ET ÉTABLISSEMENTS SOUS TUTELLE

AFSSAPS
Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

Décision DG n° 2010-225 du 13 octobre 2010 portant création à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé du groupe de travail sur les dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux

NOR : SASM1030919S

Le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé,
Vu le code de la santé publique, et notamment les articles L. 5311-1 et suivants, R. 5212-7 à R. 5212-11 et D. 5321-7 et suivants ;

Vu l'arrêté du 27 novembre 2007 portant nomination à la Commission nationale des dispositifs médicaux,

Décide :

Article 1^{er}

Il est créé auprès du directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé un groupe de travail sur les dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux. Ce groupe de travail, rattaché à la Commission nationale de sécurité sanitaire des dispositifs médicaux, est chargé de :

- réaliser un état des connaissances sur les dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux et leur évaluation biologique ;
- proposer des recommandations à destination des fabricants développant ce type de dispositifs médicaux.

Article 2

Les membres du groupe de travail sont désignés par le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé pour une durée d'un an renouvelable.

Article 3

Le président du groupe de travail est désigné parmi les membres nommés par le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

Article 4

Les travaux du groupe de travail sont confidentiels.

Article 5

Les membres du groupe de travail ne peuvent prendre part aux travaux du groupe s'ils ont un lien direct ou indirect avec le dossier examiné.

Article 6

Le directeur de l'évaluation des dispositifs médicaux est chargé de l'exécution de la présente décision, qui sera publiée au *Bulletin officiel* du ministère de la santé.

Fait à Saint-Denis, le 13 octobre 2010.

Le directeur général,
J. MARIMBERT

BO Santé – Protection sociale – Solidarité n° 2010/11 du 15 décembre 2010, Page 66.

ADMINISTRATION

AUTORITÉS ADMINISTRATIVES INDÉPENDANTES ET ÉTABLISSEMENTS SOUS TUTELLE

AFSSAPS
Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

Décision DG n° 2010-226 du 13 octobre 2010 portant nomination au groupe de travail sur les dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

NOR : SASM1030821S

Le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé,
Vu le code de la santé publique, et notamment les articles L. 5311-1 et suivants, R. 5212-7 à R. 5212-11 et D. 5321-7 et suivants ;

Vu l'arrêté du 27 novembre 2007 portant nomination à la Commission nationale des dispositifs médicaux ;

Vu la décision DG n° 2010-225 du 13 octobre 2010 portant création à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé du groupe de travail sur les dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux,

Décide :

Article 1^{er}

Sont nommées membres du groupe de travail sur les dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux les personnes dont les noms suivent :

M. FELTIN (Nicolas) ;
Mme FRAMERY (Sylvie) ;
Mme HARMAND (Marie-Françoise) ;
M. POUPON (Joël) ;
Mme VAYSSADE (Muriel) ;
M. VILLIERS (Christian).

Article 2

M. POUPON (Joël) est nommé président du groupe de travail.

Article 3

Le directeur de l'évaluation des dispositifs médicaux est chargé de l'exécution de la présente décision, qui sera publiée au *Bulletin officiel* du ministère de la santé.

Fait à Saint-Denis, le 13 octobre 2010.

Le directeur général,
J. MARIMBERT

ANNEXE II : Liste des dispositifs médicaux dans le domaine des nanotechnologies, identifiés lors des travaux du présent rapport

Nom commercial du dispositif médical	NOM DU FABRICANT (Pays)	Description du dispositif	Nanotechnologie utilisée
Acticoat®	SMITH & NEPHEW (Royaume-Uni)	Pansement	Nanoparticules d'argent métallique (à partir de 15 nm) Silcryst™
NanoFense™	APPLIED NANOSCIENCES	Masque chirurgical filtrant des virus grippaux	Nanoparticules d'argent
	SCOUTBURG (Taiwan)	Masque chirurgical	Nanoparticules d'argent
Mipan® Magic Silver Nano	HYOSUNG (Corée)	Textile à effet antimicrobien permanent	Nano-argent
NanoMask®	EMERGENCY FILTRATION PRODUCTS (USA)	Masque chirurgical	Nanoparticules d'oxyde de magnésium
Aerosil®	DEGUSSA (Allemagne)	Composite de restauration dentaire	Nanoparticule de dioxyde de silice (7-40 nm)
Filtek™ Supreme	3M ESPE (USA)	Composite de restauration dentaire photopolymérisable	Nanoparticules de silice
Adper™ Scotchbond™ SE	3M ESPE (USA)	Système adhésif auto-mordant	Nano-charges de zircone silanisées
Ketac™ N100	3M ESPE (USA)	Composite de restauration dentaire	Nano-ionomère
Kappalux Nano	PRODUITS DENTAIRE PIERRE ROLLAND (France)	Produit de restauration dentaire à base de résine synthétique	Nanoparticules de dioxyde de silicium et d'oxyde de zirconium (10-100 nm)
Grandio®	VOCO (Allemagne)	Composite de restauration dentaire	Nano-composite hybride
Optiglaze	GC CORPORATION (Japon)	Composite de restauration dentaire photopolymérisable	Nano-charges de silice
Nanogel®	TEKNIMED (France)	Produit pour comblement osseux injectable	Hydroxyapatite nanoparticulaire (100-200 nm)
Nanostim™ / Ostim®	AAP BIOMATERIALS (Allemagne) / MEDTRONIC (France)	Produit pour comblement osseux injectable	Hydroxyapatite nanoparticulaire
PerOssal®	AAP BIOMATERIALS (Allemagne)	Produit pour comblement osseux injectable	Hydroxyapatite nanoparticulaire
FortrOss®	PIONEER SURGICAL TECHNOLOGY (USA)	Produit pour comblement osseux	Nanoparticules d'hydroxyapatite de la technologie NanOss® avec la matrice ostéoconductive E-Matrix
Vitoss® Scaffold	ORTHOVITA (USA)	Produit pour comblement osseux	Phosphate de calcium de porosité nanométrique
Puretex®	SYBRON IMPLANT SOLUTIONS (USA)	Implant orthopédique métallique nanostructuré	Titane pur ayant une topographie nanométrique de la surface nanoporeuse
NanoImplant®	TIMPLANT (République Tchèque)	Implant dentaire métallique	Titane nanostructuré
Nanos™	SMITH&NEPHEW (Royaume-Uni)	Prothèse orthopédique	Revêtement microporeux Bonit® nanocristaux d'hydroxyapatite fabriqué par DOT (Allemagne)
Symax™	STRYKER (France)	Prothèse articulaire	Revêtement microporeux Bonit® nanocristaux d'hydroxyapatite fabriqué par DOT (Allemagne)
NanoTite™	BIOMET 3i	Prothèses orthopédique et dentaire	Dépôt en surface de nanocristaux de phosphate de calcium (20-100 nm)
Debiostent™	DEBIOTECH (Suisse)	Revêtement de stent	Revêtement nanostructuré en céramique (TiO ₂ , ZrO ₂ , SiO ₂ , IrO ₂ , Al ₂ O ₃ , CaP) d'épaisseur de 100 nm à 10 µm

Nom commercial du dispositif médical	NOM DU FABRICANT (Pays)	Description du dispositif	Nanotechnologie utilisée
Rheo Knee	OSSUR (Islande)	Prothèse externe de genou	Nanoparticules de fer (100 nm à 1000 nm)
	ALCOVE SURFACE (Allemagne)	Revêtement de stent	Revêtements nanostructuré d'oxyde d'aluminium (Al ₂ O ₃) d'épaisseur de 300 nm
Catania™	CELONOVA BIOSCIENCES (Canada)	Stent coronaire nu	Revêtement de polymère Polyzene®-F (épaisseur de 40-50 nm)
VestaSync™	MIV THERAPEUTICS (Canada)	Stent "actif"	Revêtement ultra-fin en hydroxyapatite, avec une porosité de 100-500 nm
ON-Q® SilverSoaker™	I-FLOW CORP.	Cathéter pour anesthésie	Revêtements incorporant des nanoparticules d'argent (technologie SilvaGard™) fabriqué par ACRYMED (USA)
AVflo™	NICAST (Israël)	Greffon d'accès vasculaire auto-obturateur	Nanotissu de polymère électrofilé
NovaMesh™	NICAST (Israël)	Trellis herniaire intra-abdominal	Nanotissu de polymère électrofilé
	Equipe du Royal Free Hospital de Londres (Royaume-Uni)	Greffon vasculaire	Nanocages d'UCL-NanoBio™, formant un nanocomposite de polymère breveté
	ROSKARDIOINVEST (Russie)	Valve cardiaque artificielle nanostructurée	Revêtement de carbone nanostructuré
Diamaze PSD	GFD GESELLSCHAFT FÜR DIAMANTPRODUKTE MBH (Allemagne)	Lame de scalpel	Revêtement nanostructuré en diamant (épaisseur de 20-40 nm)
Sandvik Bioline 1RK91™	AB SANDVIK MATERIALS TECHNOLOGY (Suède)	Aiguille de suture	Nanocristaux d'acier inoxydable (1-10 nm)
Mako	ORTHOSENSOR (USA)	Appareil chirurgical livrant des données précises sur l'implantation orthopédique personnalisée du genou	Nanocapteurs
Nano-cancer	MAGFORCE NANOTECHNOLOGIES (Allemagne)	Nanoparticule utilisée dans la thérapie des cancers	Nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques (15 nm environ) recouvertes d'aminosilanes
NanoXray	NANOBIOTIX (France)	Nanoparticule utilisée dans la thérapie des cancers	Nanoparticules d'oxyde d'hafnium (70-100 nm)
AuroShell	NANOSPECTRA BIOSCIENCES (USA)	Nanoparticule utilisée dans la thérapie des cancers	Nanoparticules de silice recouvertes d'or (diamètre de 150 nm)
Brachysil™	PSIVIDA (Australie)	Dispositif médical pour le traitement du cancer de la prostate	Microparticules de 30 µm de silicium mais avec des pores nanométriques nommées BioSilicon incorporant du phosphore radioactif ³² P
NanoKnife™	ANGIODYNAMICS (USA)	Technique d'ablation de tumeurs reposant sur l'électroporation irréversible de cellules cancéreuses	Ouverture de nano-pores irréversibles dans les membranes cellulaires
	RETINA IMPLANT (Allemagne)	Implant rétinien	Composant nano-électronique
Argus™	SECOND SIGHT MEDICAL PRODUCTS (USA)	Implant rétinien	Composant nano-électronique
	équipe américaine du MIT (Massachusetts Institute of Technology)	Dispositif de surveillance de la glycémie in vivo, mis en place sous la peau	Nanotubes de carbone
Verigene	NANOSPHERE (USA)	Test génétique et pharmacogénétique	Nanoparticules d'or