APPORT DE LA MÉTROLOGIE DES AÉROSOLS POUR LES ÉTUDES DE TOXICOLOGIE PAR INHALATION

F. Cosnier*, S. Bau, S. Grossmann, S. Viton, H. Nunge, R. Payet, C. Seidel, L. Gaté.

Institut National de Recherche et de Sécurité, 54519 Vandoeuvre, France
*frederic.cosnier@inrs.fr

TITLE

Aerosol metrology contribution for inhalation toxicology studies

RESUME

En 2014, l'INRS s'est doté d'un système de génération de nanoaérosols adapté aux études de toxicologie par inhalation. Baptisé NanoTIREx pour « Nanomaterial Toxicology Inhalation system for Rodent Exposure », ce dispositif a depuis été mis en œuvre au cours d'une quinzaine de campagnes d'exposition subaiguë (1 mois) avec différents types d'aérosols (issus de différentes natures de poudre et avec des granulométries et des niveaux de concentrations variés). Nous proposons de faire un retour d'expérience et d'évoquer quels ont été les challenges à relever pour mener à bien ce type d'expérimentation et en quoi la mise en place d'une stratégie de métrologie des aérosols adaptée a permis de surmonter certains obstacles et de répondre aux besoins de la toxicologie.

ABSTRACT

INRS has developped a nanoaerosol generation system adapted to inhalation toxicology studies called NanoTIREx for "Nanomaterial Toxicology Inhalation System for Rodent Exposure". Since 2014, this inhalation facility has been implemented during fifteen subacute exposure campaigns (1 month) with different types of aerosols (from different powder and with varying sizes distributions and concentrations). We propose to make a 5-year feedback and to discuss what were the challenges to be faced with this type of experimentation and how a well-designed aerosol metrology strategy allowed to overcome certain obstacles and meet the needs of toxicology.

MOTS-CLÉS : inhalation, toxicologie, aérosol, metrologie / **KEYWORDS:** inhalation, toxicology, aerosol, metrology

1. INTRODUCTION

L'effet des nanomatériaux sur la santé des travailleurs (et des consommateurs) reste un sujet de préoccupation. Puisqu'ils peuvent être aérosolisés, la principale voie d'exposition professionnelle est l'inhalation. Pour cette raison, les études toxicologiques impliquant l'inhalation de nanoaérosols par des animaux restent l'approche la plus pertinente. Bien qu'elles nécessitent des moyens humains, matériels et financiers importants et qu'elles soient consommatrices de temps, elles présentent l'avantage de refléter un scenario d'exposition réaliste en permettant une distribution des nanomatériaux inhalés dans tout le système respiratoire en tenant compte de ces spécificités physiologiques. Parce qu'il partage des similitudes avec l'être humain en termes d'anatomie, de physiologie et de sensibilité aux maladies, le modèle rongeur (plus particulièrement le rat) est très utilisé.

Des lignes directrices pour les essais de toxicité de produits chimiques par inhalation ont été édictées par l'OCDE (2009, 2018) ; leurs suivis doivent permettre la production de données fiables et intercomparables pour l'estimation quantitative des risques liés à l'inhalation. Alors qu'un certain nombre de conditions d'exposition doivent être remplies pour garantir le bien-être animal (contrôle de la température et de l'humidité relative, des concentrations en O_2 et CO_2, des débits d'air, des pressions relatives, …), d'autres paramètres liés à l'atmosphère d'essai elle-même doivent être mesurés et/ou démontrés : concentration atmosphérique réelle en produit chimique, stabilité dans le temps (de quelques heures à plusieurs semaines).

Lorsque la substance d'intérêt est sous forme d'aérosol, le choix de l'équipement permettant une génération stabilisée (y compris à des niveaux de concentration parfois élevés) et la stratégie de métrologie mise en œuvre revêtent une importance capitale. Cette dernière doit ainsi permettre 1) la mesure journalière des niveaux de concentration en aérosol, 2) la caractérisation fine de l'aérosol et le maintien dans le temps de la distribution granulométrique et 3) la détermination de paramètres nécessaires à l'estimation des dépôts (via l'utilisation de modèles), eux-mêmes indispensables à l'établissement de relations dose-effet.

2. NATURE DES POUDRES ÉTUDIÉES ET DESCRIPTION DES MODALITES D'EXPOSITION

Six types de poudres ont été aérosolisés au cours de 15 campagnes d'inhalation :

- un dioxyde de titane (TiO_2), le P25 (Evonik),
- un noir de carbone (NC), le Printex90 (Evonik),

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2020-19758 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs

- deux nanotubes de carbones (NTC) longs et épais, le NM-401 (JRC) et le MWNT-7 (Mistui),
- un NTC court et fin, le NM-403 (JRC),
- une silice cristalline (SiO_2), le DQ-12 (DMT).

Les rats étaient exposés de manière subaiguë pendant quatre semaines (6 heures par jour, 5 jours par semaine) par voie oro-nasale (dans des tours d'inhalation).
Pour répondre aux besoins (notamment le niveau de concentration souhaité et l'effectif à exposer) et aux contraintes (de sécurité en particulier) liées à chaque exposition, deux configurations du système de génération et d'exposition (pouvant intégrer certaines variantes) ont été mises en œuvre au cours du temps (cf. tableau 1).

- La première décrite par Cosnier *et al* (2016) permet d'alimenter 6 à 7 tours (de 9 ports chacune) parallèlement à une fuite passant par un filtre HEPA sur lequel un contrôle de la pression relative est effectué. Dans cette configuration, différents types de générateurs peuvent être utilisés : générateur à brosse tournante (RBG1000G de PALAS), nébuliseur (AGK2000 de PALAS), ou générateur de poudre à anneau rotatif (SAG410/U de TOPAS).
- Pour certains matériaux, les NTC et la silice cristalline, le choix d'utiliser un système complétement étanche a été fait. Dans cette configuration, les poudres sont dispersées à l'aide d'un générateur acoustique (de chez IESTechno) capable d'alimenter 4 lignes en parallèle (soit 4 tours ou 8 tours si 2 tours en série par ligne) (McKinney *et al*, 2009). L'acquisition récente d'une version haute pression de ce générateur acoustique permet désormais d'alimenter 8 tours en parallèles.
- Dans chacune des configurations, deux lignes de dilution (d'air sec et d'air humide) permettent de réguler les niveaux de concentration en aérosols et en humidité relative.

Des essais ont été conduits pour générer 2 à 3 niveaux de concentrations différents de manière simultanée afin d'exposer 2 à 3 groupes d'animaux. Outre le fait que cette option complique énormément le système (besoin d'ajouter des lignes de dilutions supplémentaires, nécessité de maintenir le niveau d'humidité relative constant pour tous les différents groupes d'exposition, multiplication des points de prélèvements pour le monitoring et la caractérisation des aérosols), elle n'était pas sans incidence sur la granulométrie des aérosols générés ; l'homogénéité des dépôts (fraction déposée et localisation) n'était donc pas garantie entre les groupes.
Cette solution a donc été abandonnée ; une seule concentration est désormais générée, le groupe d'exposition « forte concentration » est exposé chaque jour 6 h à cette concentration (*C*) unique tandis que les groupes « médium » ou « faible concentration » sont exposés à des durées (*t*) plus courtes permettant de créer des équivalents concentration selon le protocole $C \times t$ (OCDE, 2009). Dans le cas de l'exposition MWNT-7 par exemple, les groupes 0,5 ou 0,15 mg/m^3 sont en réalité exposés 120 et 36 min respectivement par jour contre 6 h pour le groupe 1,5 mg/m^3. Il est à noter qu'en dehors de leur période d'exposition aux aérosols, les animaux des groupes exposés tout comme ceux des groupes témoins restent placés dans des tubes de contention et sont exposés à de l'air dépourvu de particule régulé en humidité et en température.

Tableau 1. Résumé des différentes campagnes d'inhalation réalisées

Nature Poudre	Concentrations cibles (mg/m^3)	Configuration utilisée	Nb tours exposées‡	Générateur utilisé
P25 (TiO_2)	15 ; 10 ; 7,5* ; 5* ; 1,5* ; 0,75*	#1	6 à 7	RBG1000G
P25 (TiO_2)	5!	#1	6	AGK2000 (×2)
Printex90 (NC)	50,0 ; 15,0* ; 5,0*	#1	7	SAG410/U
NM-401 (NTC)	1,5 ; 0,5	#2	4	Acoustic generator
NM-403 (NTC)	1,5 ; 0,5	#2	4	Acoustic generator
DQ-12 (SiO_2)	5,0 ; 1,5* ; 0,5*	#2	4×2	Acoustic generator
MWNT-7 (NTC)	1,5 ; 0,5* ; 0,15*	#2	8	Ac gen (high pressure)

! cet aérosol est produit à partir d'une suspension par nébulisation
** équivalents concentration selon le protocole C × t*
‡ chaque tour présente 9 ports, l'un d'eux est systématiquement réservé pour les contrôles métrologiques.

3. STRATÉGIE DE CARACTÉRISATION DES AÉROSOLS

La stratégie de caractérisation des aérosols mise en place telle que proposée dans le livrable 2.7 du projet NANoREG s'articule autour de deux objectifs (Bau *et al*, 2018 ; Cosnier *et al*, 2016).

- Le premier objectif est d'assurer une surveillance de la qualité des aérosols produits afin de déterminer les performances de la méthode de génération ; il repose en particulier sur l'utilisation de (1) un compteur de noyaux de condensation (CPC) pour la mesure en ligne de la concentration en nombre totale des particules (d_p < 3 µm), (2) un compteur optique de particules (OPC) permettant de déterminer la distribution en tailles ainsi que la concentration en nombre de particule (0,18 < d_p < 18 µm), (3) un photomètre pour la mesure

en temps réel de la concentration massique ($0,1 < d_p < 10$ µm selon les spécifications du fabriquant). La concentration massique moyenne est également déterminée précisément par analyse gravimétrique grâce à des prélèvements sur filtres (PVC ou PTFE 25 mm, diamètre des pores 5,0 ou 3,0 µm) en cassettes fermées (deux à quatre par jour en fonction du niveau de concentration). Afin d'estimer la variabilité de l'aérosol au sein de l'installation (inter-tours) et dans le temps (intra- et inter-jours), une rotation des mesures et des prélèvements sur toutes les tours est effectuée chaque jour pendant toute la période d'exposition.

- Le second objectif est la caractérisation approfondie de l'aérosol en utilisant des instruments temps-réel tels que les spectromètres aérodynamique (APS) ou de mobilité électrique (SPMS), l'impacteur basse pression à mesure électrique (ELPI). L'échantillonnage pour analyses a posteriori est également d'une grande importance pour caractériser les aérosols produits conformément à la norme ISO 13014 (ISO, 2012) qui identifiait l'état d'agrégation / d'agglomération, la forme, la surface spécifique, la charge superficielle, la composition (composition chimique, structure cristalline et impuretés), la chimie de surface et la solubilité / dispersibilité comme paramètres physico-chimiques à caractériser.

4. APPORT DE LA METROLOGIE POUR LA QUALITE ET L'EXPLOITATION DES RESULTATS

Le tableau 2 résume les principales caractéristiques de quelques aérosols produits. En dehors de certaines expositions où les limites des dispositifs de génération étaient proches d'être atteintes (P25 à 15 mg/m³, NM-403 ou MWNT-7 à 1,5 mg/m³), les concentrations (massiques) réelles obtenues étaient proches des concentrations cibles avec des coefficients de variation inférieurs à 20 % (recommandés par l'OCDE pour les aérosols liquides ou solides). Soumises à des variations du même ordre de grandeur, les concentrations en nombre mesurées couvraient quant à elles une plage allant de 10^2 à 5.10^5 particules/cm³.

Tableau 2. Principales caractéristiques des aérosols produits

Nature Poudre	Concentration cible (mg/m³)	Concentration réelle (mg/m³)	C_N* (part/cm³)	DAN# (µm)	GSD	DAMM† (µm)	ρ‡ (g/cm³)
P25	15	15,3 ± 4,7	5,1E4 ± 1,7E4	0,31	1,74	1,56	1,70
P25	5[!]	5,09 ± 0,65	2.7E5 ± 2,0E4	0,27	1,75	0,40	1,05
Printex90	50	50,1 ± 3,9	3,5E5 ± 1,4E5	0,03	1,97	0,94	0,35
				0,20	2,11		
NM-401	1,5	1,49 ± 0,24	2,5E3 ± 2,6E2	0,28	1,83	0,79	0,36
	0,5	0,54 ± 0,11	6,7E2 ± 1,2E2				
NM-403	1,5	1,48 ± 0,63	4,5E2 ± 7,5E1	1,44	1,48	1,94	0,10
	0,5	0,50 ± 0,14	1,1E2 ± 2,5E1				
DQ-12	5,0	5,14 ± 0,70	1,7E3 ± 2,4E2	1,50	1,60	2,70	0,99
MWNT-7	1,5	1,69 ± 0,49	1,4E3 ± 4,6E2	0,40	1,93	1,78	0,45

[!] *cet aérosol est produit à partir d'une suspension par nébulisation*
* *$d_p < 3$ µm*
[#] *DAN = diamètre aérodynamique modal en nombre (déterminé par mesures SMPS et APS)*
[†] *DAMM = diamètre aérodynamique médian en masse (déterminé par mesures DLPI+)*
[‡] *ρ = densité effective moyenne de l'aérosol (déterminée par optimisation sur le couple de mesures SMPS et APS, cf. Bau et al. 2018)*

A l'exception de l'aérosol produit à partir de la silice DQ12, l'ensemble des aérosols produits présente des diamètres aérodynamiques médians en masse (DAMM) inférieurs à 2 µm, faiblement polydispersés avec des écarts-types géométriques (GSD) compris entre 1,5 et 2,1 en accord avec la nouvelle ligne directrice OCDE 412 de 2018. La connaissance de paramètres tels que les diamètres modaux ou médians en nombre et en masse est de la plus haute importance lorsqu'il s'agit de comparer les résultats issus de différentes études de toxicologie. C'est pourtant sur ce point que l'on constate dans la littérature les plus grandes carences. A titre d'exemple (cf. lignes 1 et 2 du tableau 2), des aérosols de TiO_2 P25 obtenus à partir de deux dispositifs de génération (par voie sèche ou voie humide) peuvent présenter des distributions en nombre semblables alors que leurs distributions en masse sont différentes ; sans cette dernière information, l'interprétation des résultats toxicologiques peut être rendue difficile.

Par ailleurs, la connaissance des distributions en masse ou en nombre (associée pour cette dernière à la détermination de la densité effective de l'aérosol) permet d'estimer les dépôts dans les voies respiratoires avec des modèles tels que le MPPD (Multiple-Path Particle Dosimetry Model) développé par Applied Research Associates (Anjilvel et Asgharian, 1995). Dans certains cas, le dosage des fractions retenues (ou charge pulmonaire) chez l'animal est difficile en raison de la nature des matériaux. Il est ainsi complexe de doser le carbone inorganique lié à la présence de NC ou de NTC dans une matrice biologique (comme le poumon) composée de carbone organique. Grace à la caractérisation fine des aérosols et à l'estimation des dépôts (ou mieux encore des doses exprimées en termes de surface déposée), nous avons pu récemment relier et comparer les effets induits par le NM-401 et le NM-403 sur l'inflammation pulmonaire suite à des inhalations

et des instillations (Gaté *et al*, 2019). Plus généralement, nous sommes désormais en mesure d'anticiper la réponse inflammatoire liée à l'exposition à des aérosols de NTC ou de matériaux faiblement solubles et faiblement toxiques.

Ce travail a fait l'objet de soutien financier de la part de l'ANSES et de l'Europe au travers des projets « NANOTRANSBRAIN », « NANOREG » et H2020 « SMARTNANOTOX ».

Anjilvel, S. and Asgharian, B. (1995) Fundam. Appl. Toxicol., 28, 41-50.

Bau, S., Bourrous, S., Gaie-Levrel, F. and Witschger, O. (2018) J. Nanopart. Res., 20, 12.

Cosnier, F., Bau, S., Grossmann, S., Nunge, H., Brochard, C., Viton, S., Payet, R., Witschger, O. and Gate, L. (2016) AAQR, 16, 2989-3000.

Gaté, L., Knudsen, K. B., Seidel, C., Berthing, T., Chezeau, L., Jacobsen, N. R., Valentino, S., Wallin, H., Bau, S., Wolff, H., Sebillaud, S., Lorcin, M., Grossmann, S., Viton, S., Nunge, H., Darne, C., Vogel, U. and Cosnier, F. (2019) Toxicol Appl Pharmacol, 375, 17-31.

ISO (2012) TR 13014. Nanotechnologies—Guidance on physicochemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment

McKinney, W., Chen, B. and Frazer, D. (2009), Inhal Toxicol, 21, 1053-1061.

OCDE (2009) Essai n° 403 : Toxicité aiguë par inhalation

OCDE (2018) Essai n° 412 : Toxicité subaigüe par inhalation : étude sur 28 jours

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2020-19758 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs