

## Compte rendu du forum du 13 octobre 2016

### Comment évaluer la toxicité des nanomatériaux ?

#### Approches, méthodes, perspectives

Aujourd'hui, les effets biologiques des nanomatériaux présents dans nombre de produits commerciaux, en cas d'exposition, restent mal connus. Ce sont en effet des substances chimiques particulièrement difficiles à évaluer. Dans son avis d'avril 2014, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) en donnait trois raisons. *Primo*, chaque nanomatériau est un cas particulier car sa toxicité et son devenir dans l'environnement dépendent de différents paramètres physico-chimiques qui évoluent tout au long de son cycle de vie. *Secundo*, la qualité des études scientifiques est hétérogène. *Tertio*, le contenu scientifique de la définition des nanomatériaux fait toujours débat. L'Anses notait cependant que des progrès méthodologiques étaient en cours. Deux ans et demi plus tard, il est donc important de faire le point sur les approches et les méthodes qui nous permettront d'avancer rigoureusement dans la connaissance des nanomatériaux et de leurs effets biologiques et environnementaux.

#### 1) Caractériser les effets cellulaires et tissulaires des nanomatériaux

**Jérémie Pourchez**, Responsable du département « Biomatériaux et Particules Inhalées », INSERM U1059, École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

#### 2) Comment mesurer la toxicité génétique ?

**Sylvie Chevillard**, CEA, Institut de recherche en radiobiologie cellulaire et moléculaire (IRCM), Fontenay-aux-Roses

#### 3) Évaluer le devenir des nanoparticules dans les écosystèmes

**Marc Benedetti**, Institut de physique du globe de Paris (IPGP - Sorbonne Paris Cité - CNRS), équipe Géochimie des eaux

Discutant : **Daniel Bernard**, CEA, Plate-forme NanoSécurité, Président de la Commission AFNOR X457 Nanotechnologies

---

**Dorothee Browaeys** accueille les participants dont beaucoup de nouveaux. Elle signale que la saison est aux vendanges et que nous sommes en train de préparer un panorama des 12 séances réalisées depuis 3 ans. Un questionnaire a déjà été envoyé aux participants habituels et des exemplaires sont à remplir ce soir pour ceux qui ne l'ont déjà fait. Nous nous rapprochons aussi de la fin d'année, moment où l'Alliance qui réunit les financeurs se réunit. Le RV est fixé au 21 novembre. Dorothee Browaeys encourage ceux qui souhaitent s'impliquer dans la dynamique du Forum où se rapprocher de notre action de prendre contact avec elle. Elle rappelle que chaque année un ou deux partenaires nouveaux - l'an dernier le groupe Renault – rallie(nt) l'Alliance.

### Jean-Jacques Perrier introduit la séance

Dans son avis d'avril 2014, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) notait que les dangers des nanomatériaux sont particulièrement difficiles à identifier et caractériser, compte tenu notamment de la grande diversité des nanomatériaux ; du manque de données sur les effets chez l'homme et d'études épidémiologiques en particulier ; du manque de protocoles d'étude à la fois adaptés et normalisés ; de la caractérisation physico-chimique souvent insuffisante des matériaux étudiés, ce qui bien souvent ne permet pas de comparer les résultats des différentes études entre eux. L'Anses recommandait, entre autres, d'adapter les modèles actuels ou de développer puis valider de nouveaux modèles, tests ou méthodes : modèles cellulaires plus représentatifs des organes cibles, développement de nouveaux tests de toxicité et de systèmes haut débit pour augmenter la rapidité d'investigation.

Deux ans et demi plus tard, il nous a paru important de faire le point sur certaines des approches et des méthodes qui nous permettront de caractériser les effets biologiques et environnementaux des nanomatériaux.

Le danger est un des éléments du risque, avec l'exposition. Or on confond souvent risque et incertitude. Le risque est une probabilité calculable de réalisation d'un danger identifié. L'incertitude est une probabilité de réalisation d'un effet indésirable qui n'est pas calculable faute d'informations fiables sur cet effet. Or en matière de nanomatériaux, nous sommes avant tout en régime d'incertitudes : souvent, nous ne connaissons pas l'un ou l'autre des deux facteurs du risque, la toxicité sur l'homme ou l'exposition des individus, voire ni l'un ni l'autre. La demande sociale est de réduire ce régime d'incertitudes et de passer ainsi à un régime de gestion des risques, ce qui signifie en apprendre davantage sur les effets indésirables des nanomatériaux et notamment leur toxicité. Mais comment fait-on sachant qu'analyser au cas par cas prendrait trop de temps et serait très coûteux ? C'est notamment cette question qu'aborderont les exposés de **Jérémie Pourchez** et **Sylvie Chevillard**.

Les modèles doivent refléter des expositions réalistes dans les tissus biologiques. Il y a donc plusieurs niveaux d'analyse : aller voir dans des modèles cellulaires ce qu'il se passe dans une cellule soumise à des nanoparticules, voir par exemple si le génome est affecté et pourquoi, mais aussi mettre ces observations en rapport avec la réalité *in vivo*, les routes et les doses d'exposition potentielles. Pour évaluer les expositions aux NM, il faut en outre étudier le devenir des nanoproducts tout au long de leur cycle de vie en fonction de leur vieillissement, de leur usure et des agressions qu'ils subissent. On peut aussi, comme le montrera **Marc Benedetti**, partir de l'aval, de l'environnement, détecter des substances puis essayer de remonter la chaîne pour en caractériser l'origine possible en croisant les informations concernant les nanoproducts. C'est notamment à ce croisement que les registres de nanomatériaux mis sur le marché peuvent trouver une utilité pratique.

Enfin, il est essentiel de ne pas réduire la question des nanotechnologies et des nanomatériaux à celle du risque toxique. Le sujet recouvre de multiples autres dimensions.

## 1. Caractériser les effets cellulaires et tissulaires des nanomatériaux

**Jérémie Pourchez**, Responsable du département « Biomatériaux et Particules Inhalées », INSERM U1059, École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

Les travaux sur la toxicologie des nanosubstances sont récents : c'est une science très jeune et nous n'avons pas plus de 10 ans de recul. L'ensemble du recul clinique et épidémiologique que nous avons au sujet d'objets micrométriques telles que les particules de silice, connues pour induire la silicose, ne peut pas être transposé à l'échelle nanométrique. Deuxième point : dire qu'un produit est toxique ou ne l'est pas n'a pas vraiment de sens. Paracelse, au XVI<sup>e</sup> siècle, insistait pour dire que « la dose fait le poison », il nous faut examiner la relation dose effets et réaliser des évaluations ad hoc.

### Les études chez l'animal

L'évaluation classique de la toxicité est réalisée *in vivo*, sur des animaux. Un des modes d'exposition aux nanoparticules est l'inhalation chronique. Des tests sur des rats ou souris peuvent être réalisés dans des installations spécialisées, encore assez rares en France : à l'INRS à Nancy et une autre qui devrait ouvrir prochainement à l'Ineris, en Picardie. Ces tests sont coûteux. On fait inhaler à des rats pendant 6 heures par jour et plusieurs semaines de faibles doses de nanoparticules pour mimer une exposition chronique. On sacrifie les animaux pour effectuer les analyses.

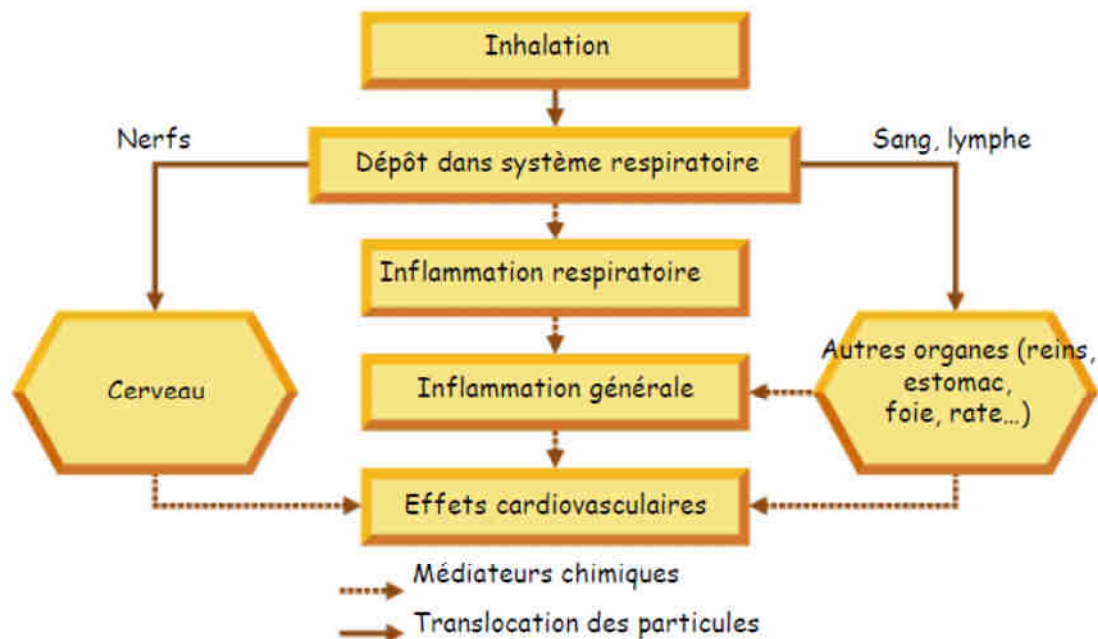
D'autres types d'études placent l'animal dans un environnement soumis à une exposition courte à forte dose. Enfin l'instillation intratrachéale apporte les nanoparticules directement dans les voies respiratoires.

### Les expériences *in vitro*

On fait pousser des cellules en cultures dans des boîtes à puits avec des nanoparticules en suspension. Ces modèles sont beaucoup moins chers. Mais quels types de cellules utiliser pour être représentatifs des expositions? Les nanoparticules induisent un biais car elles absorbent la lumière qui sert à la mesure des tests colorimétriques.

Si on étudie l'inhalation on utilise des lignées cellulaires pulmonaires, si c'est de l'ingestion on prendra des cellules intestinales. Mais les nanoparticules sont susceptibles de passer la barrière vasculaire avec des effets systémiques. La dose de particules susceptible d'atteindre tel ou tel organe va alors dépendre du scénario d'exposition.

Quels types de paramètres mesure-t-on ? Le premier est l'inflammation (via la sécrétion de cytokines) plus ou moins chronique ; les modifications génétiques (*voir plus loin l'intervention de Sylvie Chevillard*), le stress oxydant (production d'espèces oxygénées), et enfin la cytotoxicité et la mort cellulaire, étudiée au travers de l'expression de marqueurs enzymatiques. Une nanoparticule peut être cytotoxique mais pas inflammatoire ; inversement une particule inflammatoire de façon chronique pourra produire des effets délétères même sans provoquer de cytotoxicité.



Source : J. Pourchez

### Les limites

La dosimétrie est un aspect très important des études *in vitro*. La dose réellement administrée aux cellules est différente de la dose apportée dans le milieu de culture<sup>1</sup>. Comment la caractériser ? Des logiciels (*Multipath Particle Deposition Model*, MPDM) effectuent des corrélations entre doses apportées et doses reçues, mais cela reste un problème.

Autre difficulté: les métriques. En toxicité le paramètre utilisé depuis des siècles est la masse. Mais pour les nanoparticules la masse est moins pertinente que la surface. Si l'on compare différents types de nanoparticules, on constate que la surface spécifique est bien corrélée aux effets cellulaires alors que la masse ne l'est pas. Un autre paramètre important le nombre de particules, est plus difficile à évaluer.

### Une priorité : la gestion du risque nano

Le risque est le produit de dangerosité d'une substance par le niveau d'exposition. Une particule extrêmement toxique mais à laquelle l'exposition est nulle pose un risque extrêmement faible. Cependant face aux incertitudes, il est prioritaire de minimiser le risque d'exposition aux nanoparticules.

Pour cela on utilise actuellement une approche au cas par cas, en étudiant chaque type de particule. L'ISO définit ainsi 8 paramètres<sup>2</sup> alors que l'OCDE en définit une quarantaine. L'écueil actuel est de définir des protocoles standardisés pour les mesurer. L'avenir est à des conceptions dites « *Safe(r) by design* » aptes à réduire au maximum la toxicité intrinsèque des substances en jouant sur leurs paramètres physico-chimiques (taille, surface spécifique, chimie de surface, etc.).

<sup>1</sup> D. Lison, Paracelsus in nanotoxicology, *Part. Fiber Toxicol.* vol. 11, p. 35, 2014.

<sup>2</sup> Etat d'agglomération/agrégation, composition, taille des particules/distribution, forme, solubilité/dispersibilité, surface spécifique, chimie de surface, densité de charge de surface

Par exemple, nous avons étudié la toxicité cellulaire de cinq poudres industrielles de carbure de silicium, un produit utilisé comme abrasif notamment. Nous avons observé un stress oxydant corrélé à la taille des particules et une inflammation, mais pas de cytotoxicité. De là, nous avons pu proposer une modification du procédé industriel de fabrication de ces poudres pour réduire la toxicité du produit<sup>3</sup>.

A l'avenir, il faudrait aussi, pour sortir des études au cas par cas, développer le criblage à grande échelle des effets et des outils de prédiction *in silico* comme les modèles informatiques des relations quantitatives structure-activité (QSAR), très utilisés par l'industrie pharmaceutique pour identifier des candidats médicaments.

## Discussion

### **Daniel Bernard**

Il ne faut pas croire que l'on ne dispose pas de données toxicologiques sur les nanomatériaux. Les premiers travaux de toxicologie sur les nanomatériaux datent de 2001, financés soit par des programmes nationaux, soit par des programmes de la commission européenne. L'OCDE a réalisé également une collecte des données disponibles dans le monde sur quatorze famille de nano-objets, dont le dioxyde de titane, le dioxyde de cérium, le dioxyde de silicium, l'argent, l'or, les nanotubes de carbone, etc<sup>4</sup>. Les derniers rapports ont été publiés en 2015. Mais cette compilation d'études effectuées à l'aide de protocoles parfois discutables et discutés, car non validés pour les nanomatériaux, a porté sur des nano-objets dont les caractérisations structurales, physiques et chimiques sont malheureusement le plus souvent insuffisantes. La question est de savoir si l'on peut en tirer des conclusions pertinentes quant à la toxicité spécifique des nanomatériaux.

### **Jérémie Pourchez**

Il faut éviter à mon sens de parler de la toxicité d'un nanomatériau donné. Il existe par exemple non pas un dioxyde de titane mais de nombreuses formes aux propriétés différentes. L'important est donc de savoir quels sont les paramètres physicochimiques à modifier pour que les industriels produisent la forme inoffensive du dioxyde de titane qui les intéresse.

### **Jean-Jacques Perrier**

Peut-on dire qu'une étude de toxicité qui ne réalise pas la caractérisation à 8 ou 9 critères du nanomatériau étudié n'est pas valide ?

### **Daniel Bernard**

Je dirais avant tout qu'il faut être très prudent quant à l'interprétation de résultats expérimentaux obtenus sur des produits pas ou mal identifiés, et aux conclusions que l'on peut en tirer. Lors d'une réunion publique tenue à Bruxelles il y a quelques mois, dans le cadre du Nanodialog, des représentants de la Commission européenne, Otto Linher, de la

---

<sup>3</sup> D. Boudard *et al.*, In vitro cellular responses to silicon carbide particles manufactured through the Acheson process: impact of physico-chemical features on pro-inflammatory and pro-oxidative effects, *Toxicol In Vitro*, vol. 28, pp. 856-865, 2014.

<sup>4</sup> <http://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/dossiers-and-endpoints-testing-programme-manufactured-nanomaterials.htm>

DG Entreprises, Andrej Kobe de la DG Environnement et Nicolas Segebarth ont déclaré :  
« On peut considérer que les études toxicologiques actuellement disponibles sont discutables, attendons les résultats du programme NANoREG 2 qui va produire des protocoles reconnus. »

### **Jean-Jacques Perrier**

Il y a tout de même des bases de données qui recensent les effets de nanomatériaux, comme DaNa 2.0 ou NanoRiskCat<sup>5</sup>.

### **Daniel Bernard**

Il faut prendre ces bases de données avec esprit critique en regardant en détail les publications et les protocoles expérimentaux utilisés, qui doivent être pratiqués par des laboratoires respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoires, ce qui n'est pas le cas d'une très grande majorité de laboratoires académiques. Par exemple, les tests réglementaires de toxicité chronique par inhalation pour l'enregistrement dans REACH consistent à exposer une population de rongeurs (rats) pendant 3 mois, puis à procéder à un suivi d'une partie de cette population pendant 6 mois supplémentaires pour évaluer la réversibilité des effets constatés, avec des analyses biologiques et des examens des poumons *post mortem* périodiques. C'est un travail très lourd que peu de laboratoires peuvent pratiquer : en France l'INRS et bientôt l'INERIS, en Suisse le laboratoire privé HARLAN, etc.

### **Nicole Proust** (Association toxicologie chimie)

Le rat est-il représentatif des effets sur l'homme ? Toute la collection de l'OCDE va-t-elle vraiment servir à quelque chose ? Dans beaucoup d'études le protocole n'est pas validé pour le mode nanométrique.

### **Jérémy Pourchez**

Le rat est un compromis et que les coûts des études avec ces animaux sont déjà très élevés (plusieurs centaines de milliers d'euros pour une étude sur une particule). En région Rhône-Alpes, un projet sur le porc est en réflexion. Mais il faudra aussi bien maîtriser la métrologie des aérosols pour savoir véritablement les niveaux d'exposition que l'on teste.

### **Nicole Proust**

Qu'en est-il du passage possible d'une partie des nanoparticules vers le cerveau. Y a-t-il des expériences pour vérifier cela ?

### **Jérémy Pourchez**

Nous faisons beaucoup d'expériences pour vérifier quelles cibles peuvent être atteintes à partir de l'inhalation d'un aérosol. Des modèles mathématiques donnent aussi de bons résultats pour déterminer la quantité de particules qui peut se déposer dans les poumons et hors des voies respiratoires. Les particules de très petite taille (moins de 5 nanomètres) sont les plus susceptibles de franchir les barrières cellulaires mais elles ont tendance à s'agglomérer et n'existent presque plus dans l'air des ambiances de travail. Pour le passage hémato-encéphalique, des modèles de co-culture *in vitro* permettent d'étudier les translocations à travers la barrière des vaisseaux sanguins mais les doses utilisées dans la

---

<sup>5</sup> <http://www.nanopartikel.info/>; <http://nanodb.dk/en/nanoriskcat/>

littérature sont relativement éloignées des expositions réelles si bien que ces expériences ne sont pas forcément transposables à l'homme.

**Caroline Pétigny (BASF)**

La base de données DaNa 2.0 diffère de NanoRiskCat car elle est issue d'une évaluation des publications qui permet de ne retenir que celles qui ont utilisé un protocole rigoureux avec une caractérisation minimale des nanoparticules. Par ailleurs, elle s'interroge sur ce qu'il faut penser des approches de « ranking » ou de « grouping » permettant de catégoriser les nanomatériaux.

**Jérémie Pourchez** signale le projet NanoDefine qui explore les meilleures procédures expérimentales pour caractériser les nanomatériaux et quantifier leurs effets<sup>6</sup>. Le « ranking » est en effet indispensable mais on bute encore sur les paramètres principaux qui vont permettre de classer les nanomatériaux en familles. Par exemple, il serait totalement inadéquat de classer par taille les oxydes métalliques. Il est essentiel d'explorer les paramètres qui fluctuent en situation réelle pour établir un cahier des charges susceptible de réduire la toxicité intrinsèque d'un nanomatériau donné.

**Jean-Marc Aublant (LNE)** exprime la difficulté d'avoir des résultats comparables à l'heure actuelle mais aussi le fait qu'il existe des pistes de recherche et de développement, dans le cadre du projet NANoREG 2 notamment<sup>7</sup>, pour caractériser les nanoparticules et comparer les études avec des protocoles *in vitro* qui éviteront en outre de sacrifier des rats. Par ailleurs, sans avoir à impacter l'innovation, on dispose d'ores et déjà de suffisamment de données pour éviter certains nanomatériaux dangereux, et il relève de la responsabilité des entreprises de ne pas les utiliser.

**Bruno Fénéon (médecin toxicologue chez Michelin)**

Il y a quand même un certain recul dans l'utilisation de certains nanomatériaux type noir de carbone et silice amorphe, et des études épidémiologiques récentes ne montrent pas d'effet particulier. C'est le cas de l'étude de la mortalité d'une cohorte des travailleurs de l'industrie de la gomme exposés à ces deux nanomatériaux<sup>8</sup>. Il faut citer aussi les travaux d'ECETOC, le Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des substances chimiques<sup>9</sup>, qui sont d'ailleurs repris dans la réglementation REACH. Les toxicologues industriels utilisent souvent ce nouveau cadre pour l'évaluation des dangers<sup>10</sup>. Il me paraît nécessaire qu'un travail commun entre toxicologues institutionnels et toxicologues industriels puissent valider ces propositions.

---

<sup>6</sup> <http://www.nanodefine.eu/>

<sup>7</sup> <http://www.nanoreg2.eu/>

<sup>8</sup> M. Boniol *et al.*, Cancer mortality in cohorts of workers in the European rubber manufacturing industry first employed since 1975, *Annals of Oncology*, vol.27, pp. 933-941, 2016

<sup>9</sup> European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, <http://www.ecetoc.org/>

<sup>10</sup> J.H. Arts *et al.*, Case studies putting the decision-making framework for the grouping and testing of nanomaterials (DF4nanoGrouping) into practice, *Regul Toxicol Pharmacol.*, vol. 76, pp. 234-261, 2016.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230015301355> ; J.H. Arts *et al.*, A decision-making framework for the grouping and testing of nanomaterials (DF4nanoGrouping), *Regul Toxicol Pharmacol.*, vol. 71(2 Suppl):S1-27, 2015.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230015000549>

Selon **Jérémie Pourchez**, le cadre réglementaire n'est pas toujours approprié aux études de toxicologie. Ainsi Reach ne tient pas compte de la taille des objets pour les tests de toxicité. On a donc des incohérences entre ce que font les scientifiques et les règlements.

Pour **Daniel Bernard**, il y a effectivement un décalage important entre les définitions scientifiques des nanomatériaux et des nano-objets, et la recommandation de définition réglementaire du terme nanomatériaux de la Commission européenne qui ne vise que des collections de particules classiques contenant un certain nombre (50 % en nombre) de nano-objets (de taille inférieure à 100 nanomètres). La Commission européenne promet depuis plusieurs années une nouvelle définition réglementaire des nanomatériaux, et il faut espérer qu'elle prendra en compte ce décalage.

## 2. Comment mesurer la toxicité génétique des nanoparticules ?

**Sylvie Chevillard**, CEA, Institut de recherche en radiobiologie cellulaire et moléculaire (IRCM), Fontenay-aux-Roses

Depuis six ans, le CEA a demandé à ses biologistes d'explorer la toxicologie des nanosubstances (effets mutagènes, cytotoxiques ou de stress oxydants)<sup>11</sup>. Comme cela a été dit, on ne peut absolument pas extrapoler ce qui est connu à l'échelle micrométrique aux dimensions nanos. Chaque nanoparticule doit être considérée comme singulière : pour une même composition chimique, une nanoparticule de 1 nm ou de 5 nm n'aura peut-être pas le même comportement. Compte tenu de la diversité des nanoparticules au regard de la taille, la charge, la composition chimique, la structure, etc., et selon l'environnement, l'approche « produit par produit » de la toxicologie conventionnelle n'est donc pas envisageable ! Le coût pour mener des études de toxicologie sur les nanomatériaux déjà commercialisés atteindrait plus d'un milliard de dollars et prendrait 30 à 50 ans<sup>12</sup>.

### **Déterminer les mécanismes d'action**

Pour anticiper les dangers, une stratégie est d'identifier en amont les nanoparticules qui demanderont des investigations plus approfondies. Pour cela, l'essentiel est de comprendre les mécanismes d'action des nanoparticules<sup>13</sup>. Grâce à cela, on peut être mis sur la piste de dangers par analogie avec les dangers identifiés de substances chimiques connues et l'on peut éventuellement proposer un classement de dangerosité (« ranking ») et un regroupement des nanoparticules par catégories (« grouping »). La connaissance des mécanismes d'action permet également d'extrapoler avec une bonne vraisemblance les résultats obtenus *in vitro* à ce qui pourrait se passer *in vivo*.

---

<sup>11</sup> Par ailleurs, dès 2006, le comité de la prévention et de la précaution du ministère de l'écologie a demandé le développement d'une nano-toxicologie prédictive consistant à établir des classifications des nanomatériaux selon leur dangerosité, à l'aide de tests de criblage. Voir <http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/16-3.pdf>

<sup>12</sup> J.-Y. Choi *et al.*, The Impact of Toxicity Testing Costs on Nanomaterial Regulation, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, pp. 3030–3034, 2009. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es802388s>

<sup>13</sup> En 2007 l'Académie des sciences américaine a encouragé la communauté des toxicologues à faire des études mécanistiques. Voir <https://www.nap.edu/catalog/11970/toxicity-testing-in-the-21st-century-a-vision-and-a>



Pour réaliser ce tri, nous avons voulu changer d'échelle en travaillant à haut débit sur des plaques à 96 puits. C'est un mode rapide, automatisé, sur cellules humaines, donc plus extrapolables au danger chez l'être humain, apte à tester un grand nombre de nanoparticules et à des doses très variées, chroniques ou aiguës, sur des durées pouvant aller jusqu'à 3 semaines. Nous pouvons rechercher aussi bien les lésions de l'ADN, le stress oxydatif, les réactions inflammatoires que la cytotoxicité.

Il faut travailler avec des nanoparticules parfaitement caractérisées à l'aide, au moins, des 8 paramètres dont nous avons parlé précédemment. Pour le moment, nous ne sommes pas certains que tous ces paramètres seront utiles, mais il est important de les considérer afin de pouvoir revenir a posteriori sur une publication pour éventuellement réinterpréter des résultats à la lumière des connaissances qui seront acquises dans le domaine de la nanométrie.

### **Le test d'impédance**

Le test à haut débit que nous avons choisi mesure l'impédance cellulaire en temps réel, c'est-à-dire la capacité d'un courant électrique à traverser une cellule. Cette mesure reflète bien toute modification de la morphologie, du potentiel de membrane, ou de la prolifération des cellules. Pour le moment nous avons testé une cinquantaine de nanoparticules, par exemple :

- des nano-diamants de 20 à 100 nanomètres (à applications médicales potentielles) sur 4 lignées cellulaires (poumon, foie, rein, intestin). Aucun changement des profils d'impédance n'a été relevé, ce qui signifie que ces nanoparticules ne sont ni cytotoxiques ni génotoxiques<sup>14</sup>.
- Des nanoparticules de carbure de tungstène-cobalt (WC-Co), très utilisées pour fabriquer des revêtements de surfaces métalliques résistants à l'usure<sup>15</sup>. Nos résultats montrent que ces nanoparticules modifient le profil d'impédance d'une lignée rénale et d'une lignée hépatique mais pas d'une lignée pulmonaire, témoignant d'une forte cytotoxicité dès les faibles doses sur ces deux types cellulaires<sup>16</sup>.

Pour valider ces résultats, il faut vérifier que les nanoparticules entrent bien dans les cellules, surtout quand on conclut qu'il n'y a pas de toxicité. La cytométrie de flux, technique à haut débit, permet de mesurer l'incorporation des nanoparticules dans les cellules et aussi de mesurer le stress oxydant. On peut vérifier par spectrométrie Raman la signature chimique des particules entrées dans les cellules, qu'il s'agit bien de nano-diamants par exemple. On peut distinguer aussi les cellules vivantes des cellules mortes ayant ou pas incorporé les nanoparticules. Globalement ces tests sont importants car l'entrée dans les cellules est extrêmement variable en fonction de la lignée cellulaire. En cas de modifications de profils d'impédance après exposition, il faut ensuite mener d'autres expériences pour caractériser les mécanismes de toxicité, par exemple la production de radicaux oxydants (cas des particules WC-Co) ou la génotoxicité.

---

<sup>14</sup> V. Paget *et al.*, Carboxylated nanodiamonds are neither cytotoxic nor genotoxic on liver, kidney, intestine and lung human cell lines, *Nanotoxicology*, vol. 8 Suppl 1, pp. 46-56, 2014.

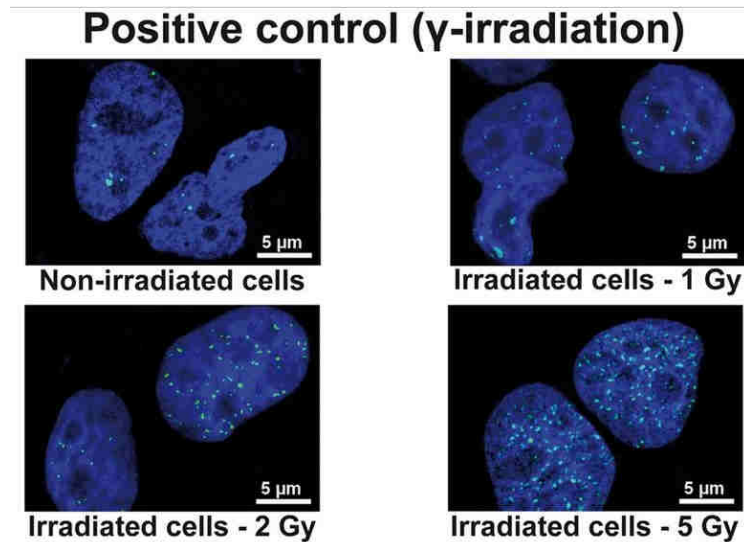
<sup>15</sup> En 2006, le carbure de tungstène-cobalt a été classé cancérigène probable par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC).

<sup>16</sup> V. Paget *et al.*, Human cell line-dependent WC-Co nanoparticle cytotoxicity and genotoxicity: a key role of ROS production, *Toxicol Sci.*, vol. 143, pp. 385-397, 2015.

<http://toxsci.oxfordjournals.org/content/143/2/385.full.pdf+html>

### La génotoxicité

En radiobiologie, pour mettre en évidence des cassures double-brins de l'ADN, on mesure la phosphorylation d'une protéine, l'histone H2AX, qui se localisent directement sur ces cassures. Des anticorps fluorescents anti-histone phosphorylée permettent de les visualiser (*points verts sur la photo ci-dessous de cellules témoins soumises à des irradiations gamma*).



Source : V. Paget *et al.*, 2015 (voir la note 16)

Pour le nano-diamant nous n'avons pas observé de génotoxicité quelles que soient la dose et la taille de ces nanoparticules. En revanche, les nanoparticules de carbure de tungstène-cobalt sont génotoxiques sur toutes les lignées cellulaires testées, via la production de radicaux libres oxydants.

Le programme NANOREG 1 auquel j'ai participé a publié ces techniques à haut débit<sup>17</sup>. Nous rédigeons actuellement des lignes directrices (guidelines) pour utiliser correctement ces techniques. Nous avons aussi commencé à comparer ces techniques avec des tests de génotoxicité réglementaires utilisés traditionnellement pour les substances chimiques (test du micronoyau et test des comètes), en collaboration avec Fabrice Nesslany à l'Institut Pasteur de Lille.

Comme je l'ai dit, les institutions nous incitent à travailler sur les mécanismes. Nous avons la chance de disposer, à la suite du séquençage des génomes, de toute une série d'outils d'analyse des « omiques », des transcriptomes et métabolomes, ce qui nous met sur la piste des mécanismes mis en jeu pour la réponse cellulaire et donc des mécanismes d'action d'une nanoparticule. Cependant ces techniques à haut débit ne sont pas encore standardisées : si l'on compare les données publiées pour un même nano-objet, on trouve des données contradictoires. Il faut aussi standardiser les analyses « omiques ».

<sup>17</sup> A.R. Collins *et al.*, High throughput toxicity screening and intracellular detection of nanomaterials, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, Jun 7 2016.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wnan.1413/full>

### **Mécanismes d'action et risque**

La détection d'un effet cellulaire ne signifie pas nécessairement un danger, ce qui est bien connu en radiobiologie. Le stress oxydatif peut être transitoire ; la cellule peut mourir ou se réparer. Il faut donc être attentif à l'interprétation des données.

L'internalisation des nanoparticules est un sujet important qui débouche sur la biopersistence. Mais celle-ci n'est pas synonyme de toxicité. Les nano-diamants sont biopersistants mais ne provoquent pas d'effet négatif détectable. De même, le passage des barrières cellulaires ne permet pas en soi d'avoir un discours prédictif quand à la toxicité.

Les tests à haut débit mesurent donc des mécanismes d'action des nanoparticules mais pas un risque.

Une étude récente a par exemple comparé le transcriptome de travailleurs exposés potentiellement à des nanotubes de carbone et de travailleurs non exposés<sup>18</sup>. Un schéma montre des gènes dérégulés dont certains sont impliqués dans le stress oxydant et la prolifération cellulaire. Cependant étant donné que les chercheurs n'ont pas vérifié la pénétration de nanotubes de carbone, que ceux-ci n'ont pas été caractérisés et que la présence éventuelle d'autres polluants n'est pas connue, estimer un risque à partir de ces seules données est excessif.

### **Des nano-diamants inertes pour explorer les causes de toxicité**

Notre base de nano-diamants inertes biologiquement peut être déclinée selon différentes modifications (revêtements, charges, etc.), en collaboration avec des équipes de physiciens du CEA. Avec des approches de haut débit et de classement de ces particules, nous cherchons actuellement à déterminer les paramètres physico-chimiques qui confèrent stress oxydant, cytotoxicité ou génotoxicité. Cela permettra de nourrir les approches « *safe(r) by design* ». Par exemple, nous avons observé que toutes les nanoparticules aminées (porteuses d'un groupement NH<sub>2</sub>) sont oxydantes et génotoxiques.

## **Discussion**

### **Daniel Bernard**

Cette approche haut débit apporte une réponse à la nécessité de multiplier les essais sur un grand nombre de produits nanos et ouvre également la voie aux approches *safer by design*, tout en évitant de passer trop vite aux études sur les animaux, longues et très coûteuses.

### **Jean-Marc Aublant**

Le Joint Research Centre (JRC) de la Commission européenne a proposé aux industriels certains protocoles standardisés (*Standard operating procedures*, SOP)<sup>19</sup>. Chaque industriel peut les utiliser. Ce qui serait bien, c'est que ces acteurs portent ces protocoles devant l'OCDE et d'autres institutions pour qu'ils puissent y être enregistrés et recommandés.

---

<sup>18</sup> A.A. Shvedova *et al.*, Integrated Analysis of Dysregulated ncRNA and mRNA Expression Profiles in Humans Exposed to Carbon Nanotubes, *PLoS One*, 2016 Mar 1;11(3):e0150628.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0150628>

<sup>19</sup> <https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/scientific-tools/web-platform-on-nanomaterials>

**Sylvie Chevillard**

C'est un peu la démarche que nous avons menée avec Fabrice Nessler pour la génotoxicité en comparant les tests réglementaires et les tests à haut débit.

**Une participante**

Le fait de moduler les propriétés physico-chimiques de nanoparticules ne modifie-t-il pas leurs qualités pour leur utilisation commerciale ?

**Sylvie Chevillard**

Bien entendu, le but du « safer by design » n'est pas de faire une nanoparticule qui ne serve plus à rien. Il y a un équilibre à trouver entre l'application envisagée et la prédiction d'une moindre toxicité.

**Armand Masion (Cerege, membre de l'équipe d'animation du Labex Sérénade)**

Dans l'approche Safe(r) by design, on joue assez peu sur la dangerosité car les propriétés de la nanoparticule changent rapidement dès que l'on commence à bricoler ses paramètres physico-chimiques. Le Safe(r) by design vise davantage l'exposition, comme le font par ailleurs les écrans anti-radiations : il s'agit de faire en sorte que le biologique ne soit pas en contact avec la nanoparticule sans altérer la propriété recherchée de la nanoparticule.

**Daniel Bernard**

L'impact sur la santé doit aussi prendre en considération tout le cycle de vie des nano-objets et leurs usages. Ces travaux sont importants car ils vont permettre d'investiguer aussi les effets des particules ultrafines de la pollution atmosphérique, qui représentent un impact sans doute plus important sur la santé que les nano-objets manufacturés.

**Sylvie Chevillard**

Il me paraît important d'aborder aussi à l'impact des mélanges de nanoparticules. Par exemple, nous nous sommes rendu compte sur des lignées de poumons qu'une nanoparticule WCo ressortait rapidement des cellules mais que la présence d'une autre nanoparticule à visée médicale empêchait sa sortie. Ces interactions sont aussi à décortiquer.

**Catherine Lindecker (IN2P3)**

Une information : le CNRS a publié une note circulaire destinée aux personnels sur la prévention des risques en laboratoire utilisant des nanoparticules<sup>20</sup>.

---

<sup>20</sup> [http://www.cnrs.fr/aquitaine/IMG/pdf/Note\\_prevention\\_risques\\_nanomateriaux\\_5mars2013.pdf](http://www.cnrs.fr/aquitaine/IMG/pdf/Note_prevention_risques_nanomateriaux_5mars2013.pdf)

### 3. Évaluer le devenir des nanoparticules dans les écosystèmes

**Marc Benedetti**, Institut de physique du globe de Paris (IPGP – Sorbonne Paris Cité – CNRS), équipe Géochimie des eaux  
[www.ipgp.fr/fr/recherche](http://www.ipgp.fr/fr/recherche)

J'aborderai ce sujet à l'aide d'exemples issus de trois thèses réalisées en partenariat avec le LNE, le BRGM et l'Anses.

Les nanoparticules que l'on retrouve dans les écosystèmes peuvent être d'origine naturelle (volcans, déserts, érosion), d'origine anthropique (pollution) ou d'origine manufacturière. Le « bruit de fond » entourant la détection des nanoparticules manufacturées est donc très important et complexe.

Nous n'avons pas encore les outils certifiés pour mesurer les nanoparticules dans différents milieux. On peut seulement estimer grâce à des prédictions de flux les quantités de nano-objets libérées dans l'environnement durant leur production et leur consommation<sup>21</sup>. Par exemple, on trouve les données suivantes aux Etats-Unis pour les eaux de surface : 15 tonnes/an de nanoparticules d'oxyde de zinc, 48 tonnes de nanoparticules de dioxyde de titane, 0,2 tonne/an de nanoparticules d'argent. En Europe, les concentrations estimées dans les eaux de surface de ces trois nanoparticules seraient respectivement de 10 ng/L, 15 ng/L et 0,76 ng/L.

Ces chiffres indiquent des concentrations très faibles, ce qui veut dire que les outils utilisés pour suivre les nanoparticules dans l'environnement doivent être certifiés à ces concentrations-là. Ces outils doivent non seulement pouvoir caractériser les nanoparticules par leur forme, leur taille, leur composition, etc., mais aussi prendre en compte toutes les transformations chimiques (adsorption, agrégation, complexation avec des molécules organiques ou minérales) qu'elles vont subir en passant d'un milieu à un autre, de l'eau douce à la mer par exemple.

#### **Une technique de fractionnement des nanoparticules**

La première technique, qui fait l'objet d'une thèse avec le LNE, est le fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique (*Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation*, A4F). On peut la coupler à différents détecteurs comme le détecteur de diffusion de lumière multi-angle (*Multiangle light scattering*, MALS) pour mesurer la taille des particules, l'état d'agrégation et/ou d'agglomération, ou la spectroscopie de masse pour déterminer la composition chimique élémentaire des nanoparticules.

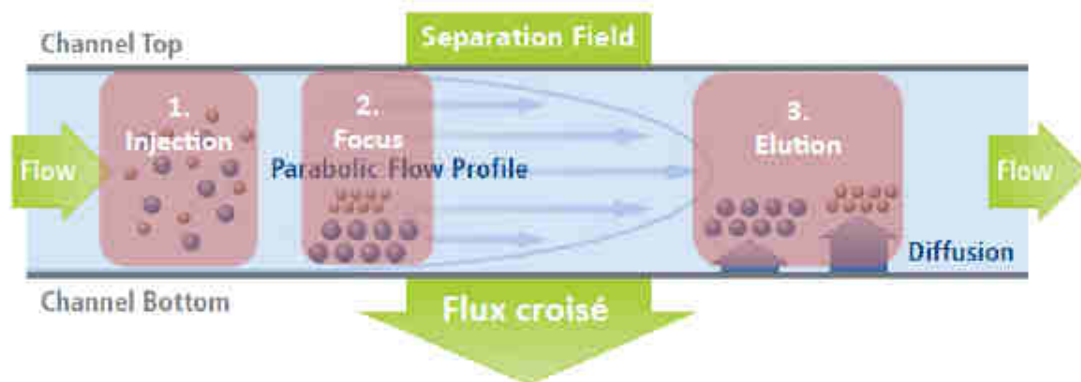
La technique consiste à injecter l'échantillon dans un canal de quelques dizaines de microns de diamètre. Sous l'action d'un flux croisé perpendiculaire au canal, les nano-objets s'organisent dans le canal en fonction de leur coefficient de diffusion (diffusion brownienne), les plus grosses particules restant en bas du canal, les plus petites diffusant dans le milieu

---

<sup>21</sup> F. Gottschalk *et al.*, Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions, *Environ Sci Technol.*, vol. 43, pp. 9216-9222, 2009.

F. Piccinno *et al.*, Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world, *J. Nanopart. Res.*, vol. 14, p. 1109, 2012.

du canal. Le flux permet ainsi de séparer les nanoparticules, les petites parvenant au bout du canal avant les plus grosses.



Source : M.F. Benedetti

Des détecteurs permettent ensuite de déterminer la nature et les caractéristiques des particules ainsi séparées. Il est nécessaire de combiner ces détecteurs pour caractériser les nanoparticules.

### Une spectrométrie de masse adaptée

Une autre approche, la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (*Single-particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, sp-ICP MS), permet d'obtenir des informations sur la distribution des tailles de nanoparticules métalliques, leur état d'agrégation, leur nombre et la composition chimique. Le principe est le suivant : l'échantillon est transporté dans un plasma à très haute température. Les nanoparticules sont alors atomisées et ionisées. Les nuages d'ions formés sont détectés par le spectromètre de masse. L'intensité du signal spectrométrique (sous forme de pics) est proportionnelle à la masse des particules, d'où l'on peut calculer leur taille en présumant qu'elles ont une forme sphérique, ce qui marche bien pour l'or et l'argent mais moins bien pour le titane.

### **Campagnes de mesures Loire et Seine**

Dans le cadre d'une thèse réalisée avec le BRGM, l'équipe de l'IPGP a recherché des nanoparticules d'oxyde de cérium (utilisé notamment dans l'automobile) et d'oxyde de titane (cosmétiques, peintures) dans le bassin de Loire (avant et après Orléans), et dans le bassin de la Seine (avant et après les déversements de l'Orge, de la Marne et de l'Oise). Sur la Loire, par exemple, nous avons observé une augmentation de la concentration de nanoparticules de cérium (taille moyenne de 24 nm) sur un lieu de baignade (île Charlemagne) situé en amont d'Orléans et au niveau des rejets de la station d'épuration (STEP). En comparant le rapport cérium/lantane détecté avec celui qui est trouvé par ailleurs, nous pouvons conclure que le cérium des rejets de la STEP est d'origine naturelle alors qu'il est d'origine anthropique au niveau de la zone de baignade. Il s'agit de « photos instantanées » susceptibles d'évoluer. Le travail sur la Seine nous a permis notamment de mesurer l'impact des affluents sur la concentration des nanoparticules de cérium et de titane.

Les nanoparticules métalliques se dissolvent-elles au cours du temps en formant des ions. On peut étudier cette question en synthétisant des nanoparticules marquées par un isotope

stable (non radioactif). On constate par exemple que les nanoparticules de zinc se dissolvent en moins de 24 heures pour plus de 50 % d'entre elles.

Une des faiblesses de la méthode de comptage des particules par spectrométrie de masse est de ne mesurer qu'une sorte de particule à la fois. Des méthodes en développement permettront de tracer plusieurs types de nanoparticules en même temps. Elles aideront aussi à mieux distinguer particules naturelles et manufacturées.

### Discussion

#### **Daniel Bernard**

Cet exposé présente des technologies très intéressantes pour la caractérisation des nanoparticules. Pensez-vous que ces techniques analytiques pourraient être utilisées également pour étudier la traçabilité des nanomatériaux, entre leur fabrication et leur fin de vie ?

#### **Marc Benedetti**

Ce type de technique a permis de tracer l'origine du plomb dans les essences à partir de comparaison de rapports isotopiques. Ces méthodes doivent progresser mais en théorie elles pourraient servir aussi à cela.

#### **Jean-Jacques Perrier**

Ces méthodes sont-elles coûteuses ?

#### **Marc Benedetti**

Un spectromètre ICP-MS coûte 300 000 euros. Une fois l'investissement réalisé, nous facturons l'utilisation en interne 25 euros de l'heure.

#### **Armand Masion**

Ces méthodes n'ont pas la sensibilité suffisante pour détecter l'état de surface des particules qui joue sur les interactions avec le vivant. Certains prônent la concentration des échantillons pour pallier cela, mais cela modifierait le comportement des nanoparticules. Qu'en pensez-vous ?

#### **Marc Benedetti**

C'est vrai, dans nos travaux antérieurs dès que l'on concentrait un échantillon de colloïdes, on pouvait constater que l'on modifiait le système étudié. Donc il faut attendre des progrès de sensibilité pour répondre à la détection des états de surface.

#### **Jean-Jacques Perrier**

Avec ces outils, à quelle échéance de temps sera-t-on capable de mesurer les concentrations réelles des principales nanoparticules dans les eaux ?

#### **Marc Benedetti**

Pour des rapports élémentaires, il faudra quelques années pour avoir les réponses sur le zinc, le titane, le cérium, l'argent, le cadmium d'origine anthropique et sur leurs différentes formes. Ce sera plus compliqué pour la silice.

\*\*\*\*\*