

LES
CAHIERS
DE LA
RECHERCHE

Santé, Environnement, Travail

Nanomatériaux et santé
Comprendre où en est la recherche

OCTOBRE 2015

Édition scientifique

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger



Éditorial

Depuis le début des années 2000, on assiste à un développement considérable de la production et des usages industriels des nanomatériaux. Parallèlement on observe une croissance forte des dépenses de recherche et du nombre de publications¹. Le nombre de produits commercialisés contenant des nanomatériaux a fortement cru dans le même laps de temps. Les questionnements quant aux risques pour la santé et l'environnement associés à cet essor technologique se sont développés en parallèle. Pour répondre à ces attentes, des travaux d'expertise à partir des données de la littérature scientifique ont été entrepris depuis une dizaine d'années. L'Anses fait régulièrement le point sur les connaissances dans ce domaine depuis 2006. Elle a également créé un groupe de travail spécifique aux « nanos » en 2012, qui a produit un nouvel avis en 2014 préconisant « *la mise en œuvre de projets de recherche pluridisciplinaire permettant de développer la connaissance des caractéristiques des nanomatériaux et de leurs dangers* ». De nombreuses agences européennes ont fait de même. Dans ce dernier avis, l'Agence appelle par ailleurs à la mise en place d'outils pour mieux maîtriser les risques et à un encadrement réglementaire renforcé au niveau européen.

Si on devait faire un constat en 2015, on pourrait résumer la situation ainsi :

- Des nanomatériaux manufacturés entrent dans la composition d'un grand nombre d'articles commercialisés ;
- Un encadrement réglementaire se met progressivement en place avec en France l'obligation prescrite par la loi de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire depuis le 1^{er} janvier 2013 ;
- L'effort d'harmonisation dans les protocoles d'analyse se poursuit afin de pouvoir comparer entre elles des études (éco) toxicologiques ;
- Des données manquent sur les expositions de la population et des travailleurs qui ne seront acquises qu'au fur et à mesure de la progression des connaissances scientifiques : d'où une approche pragmatique de « gestion graduée des risques » proposée par l'Anses et possiblement utilisable dans tous les environnements professionnels ;
- La recherche en nanotoxicologie s'est considérablement développée. Toutefois, on constate qu'il ne suffit pas de connaître la famille chimique d'une substance (comme par exemple le « dioxyde de titane ») pour prédire la toxicité de sa forme nanomatériau. L'un des enjeux de la recherche est donc d'aller au-delà, pour permettre une étude rapide de la toxicité de chaque nanomatériau.

Ces questions mobilisent de nombreux établissements Français dont ceux du réseau R31² et des universités. Citons l'InVS, l'INRS et l'Ineris qui travaillent sur la question des risques et le rôle des établissements de recherche comme le CEA, le CNRS, l'Inra, l'Inserm qui se sont fortement investis dans la recherche. Une bonne

¹ Il y en a désormais plus de 100.000 par an, selon un article de Hsinchun Chen, Mihail C. Roco, Jaebong Son, Shan Jiang, Catherine A. Larson, Qiang Gao dans *J Nanopart Res* (2013) 15

² Depuis octobre 2010, l'Anses a mis en place et anime, en vue de l'accomplissement de ses missions, un réseau d'organismes scientifiques qui interviennent dans son champ de compétences (article R1313-1 du Code de la santé publique).

partie de ces acteurs sont également parties prenantes des projets du PNR EST décrits dans ce numéro des *Cahiers de la Recherche*.

A travers le programme national de recherche environnement-santé-travail (PNR EST), des projets sur ces thématiques sont régulièrement financés, pour contribuer à faire progresser les connaissances et rapprocher la recherche des besoins en évaluation de risques. Les projets sont notamment sélectionnés en fonction de leur impact potentiel, sur la clarté de la méthode et en particulier les moyens mis en œuvre pour caractériser les particules utilisées. Le présent numéro des *Cahiers de la Recherche* en présente quatorze.

- Six portent sur la toxicité de nanoparticules. Les cibles étudiées sont variées : poumon, système nerveux central, système immunitaire, reproduction, rein. Le sixième traite du développement de fibres modèles qui pourraient être utilisées dans les études de toxicité.
- Trois projets visent à mieux comprendre le déplacement des nanoparticules dans le corps et leur capacité à franchir des barrières (poumon ou intestin) ;
- Deux traitent du devenir des nanoparticules dans l'environnement et de leurs effets sur les écosystèmes ;
- Deux projets sont orientés vers l'étude d'expositions à l'occasion de l'usure de matériaux ou au poste de travail ;
- Un projet, en sciences humaines et sociales, traite des particularités du risque nano.

L'objectif est de donner un aperçu des questions que se posent les chercheurs dans le domaine des nanomatériaux et des moyens mis en œuvre pour y répondre.

Marc Mortureux

Directeur Général de l'Anses

Retrouvez les Cahiers de la Recherche sur le site de l'Agence !

Actualités | Nos thématiques | Index A - Z | **Avis, rapports, publications** | Evènements | Appels, consultations | Presse | Presse

anses  Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Rechercher sur le site OK

Accueil > Les cahiers de la recherche

Les cahiers de la recherche

Au-delà de la mobilisation des équipes de recherche, les questions de sécurité (large) interpellent l'opinion publique. Les nanomatériaux, des radioisotopes, des produits chimiques. On attend alors des connaissances pour éclairer la gestion proportionnée de ces risques. Les interrogations portent sur la caractérisation des dangers, les expositions et à la caractérisation des risques. Ces différents axes ont mobilisé des équipes pluridisciplinaires (biologie, écotoxicologie, épidémiologie, médecine, sciences humaines et sociales...), conduisant à une amélioration des connaissances. C'est précisément pour valoriser les résultats de ces différents travaux de recherche financés, soit par le PNRPE, soit par le PNR EST, que l'Anses publie ces Cahiers de la Recherche (Santé, Environnement, Travail) accessibles au plus grand nombre.

Consultez le dernier numéro "Les résistances aux insecticides, antiparasitaires, antibiotiques... Comprendre où en est la recherche" (pdf)

Anciens numéros

Cahier de la recherche n°2 : "Risques sanitaires liés à la pollution des milieux aériens et hydriques : comprendre où en est la recherche" (pdf)

Cahier de la recherche n°1 : "Les perturbateurs endocriniens en 12 projets, comprendre où en est la recherche" (pdf)

Magazines et périodiques

- Bulletin de veille scientifique
- Bulletin épidémiologique
- EuroReference
- Les cahiers de la recherche

Avertissement à l'attention des lecteurs



Les fiches de présentation des projets de recherche reflètent les points de vue des équipes scientifiques partenaires et n'engagent ni les Ministères de tutelle ou l'Anses et les partenaires associés. Pour toute question, les contacts sont indiqués à la fin de chaque fiche.



Sommaire

Introduction.....	5
La mobilité des risques « nanos ».....	10
Vers un matériau modèle en nanotoxicologie ?.....	13
L’abrasion de nanomatériaux.....	16
Les effets des particules d’oxydes métalliques sur le poumon	19
Les effets des nanoparticules sur les neurones du centre respiratoire.....	21
La dissémination des nanomatériaux dans les milieux aquatiques naturels	23
Le transfert trophique de nanomatériaux	25
Internalisation et translocation des nanoparticules dans le poumon.....	28
Passage de la barrière air/sang de nanotubes de carbone	30
L’exposition des travailleurs au dioxyde de titane nanoparticulaire	32
Le devenir des nanoparticules dans l’intestin.....	35
Immunotoxicité de nanoparticules métalliques.....	38
Nanoparticules et cellules rénales.....	41
Nanoparticules et fonction de reproduction.....	44
Le registre R-nano.....	46
Les plans nationaux.....	48
Glossaire.....	49
Cartographie des projets.....	53
Mentions légales	54



Introduction

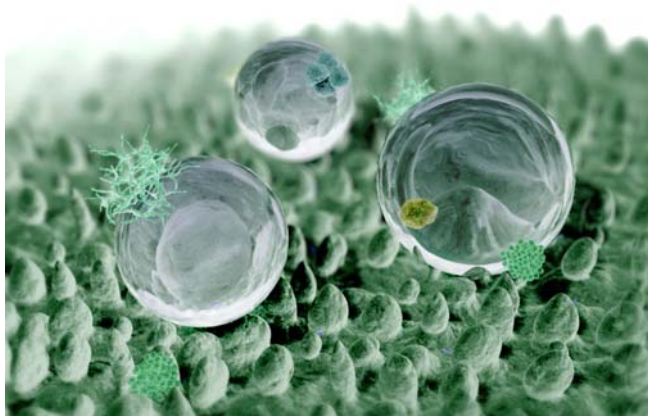
Dans la Grèce antique, le préfixe « nano » s'appliquait à un être ou un objet de très petite taille. Aujourd'hui, ce même préfixe nous fait plonger dans le monde de l'infiniment petit : celui du milliardième de mètre.



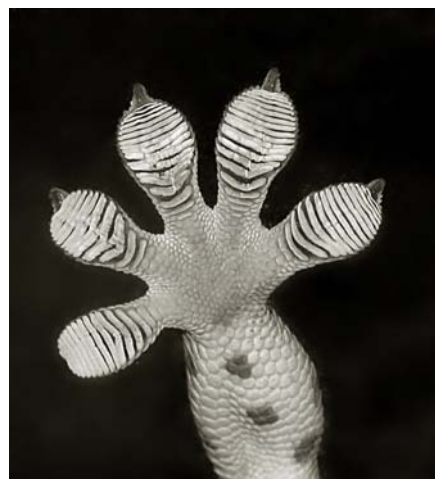
Les nanotechnologies

Depuis le début des années 2000, les nanotechnologies se sont beaucoup développées. Il s'agit de techniques qui mettent en œuvre des structurations de la matière voire des dispositifs, à l'échelle du nanomètre, c'est-à-dire du milliardième de mètre. Un nanomètre, c'est invisible à l'œil nu. Pour donner un ordre de grandeur, le rapport entre le mètre et le nanomètre est le même que celui entre le diamètre de la terre et celui d'une bille.

Les réalisations issues des nanotechnologies sont très disparates, du matériau au microprocesseur, en passant par le médicament. Travailler la matière à cette échelle, intermédiaire entre la taille des atomes et celle des matériaux massifs, lui confère des propriétés particulières, souvent totalement différentes de celles des mêmes matériaux « massifs ». Pour donner quelques exemples de ces nouvelles propriétés, cela peut être une adhérence remarquable ou « effet gecko », la super hydrophobicité, c'est-à-dire la propriété de repousser l'eau, ou « effet lotus », une résistance accrue, etc.



*Effet lotus avec trois gouttes d'eau reposant sur des microstructures
(William Thielicke, image de synthèse)*



*Détail des lamelles adhésives sous les doigts d'un gecko
(David Clements)*

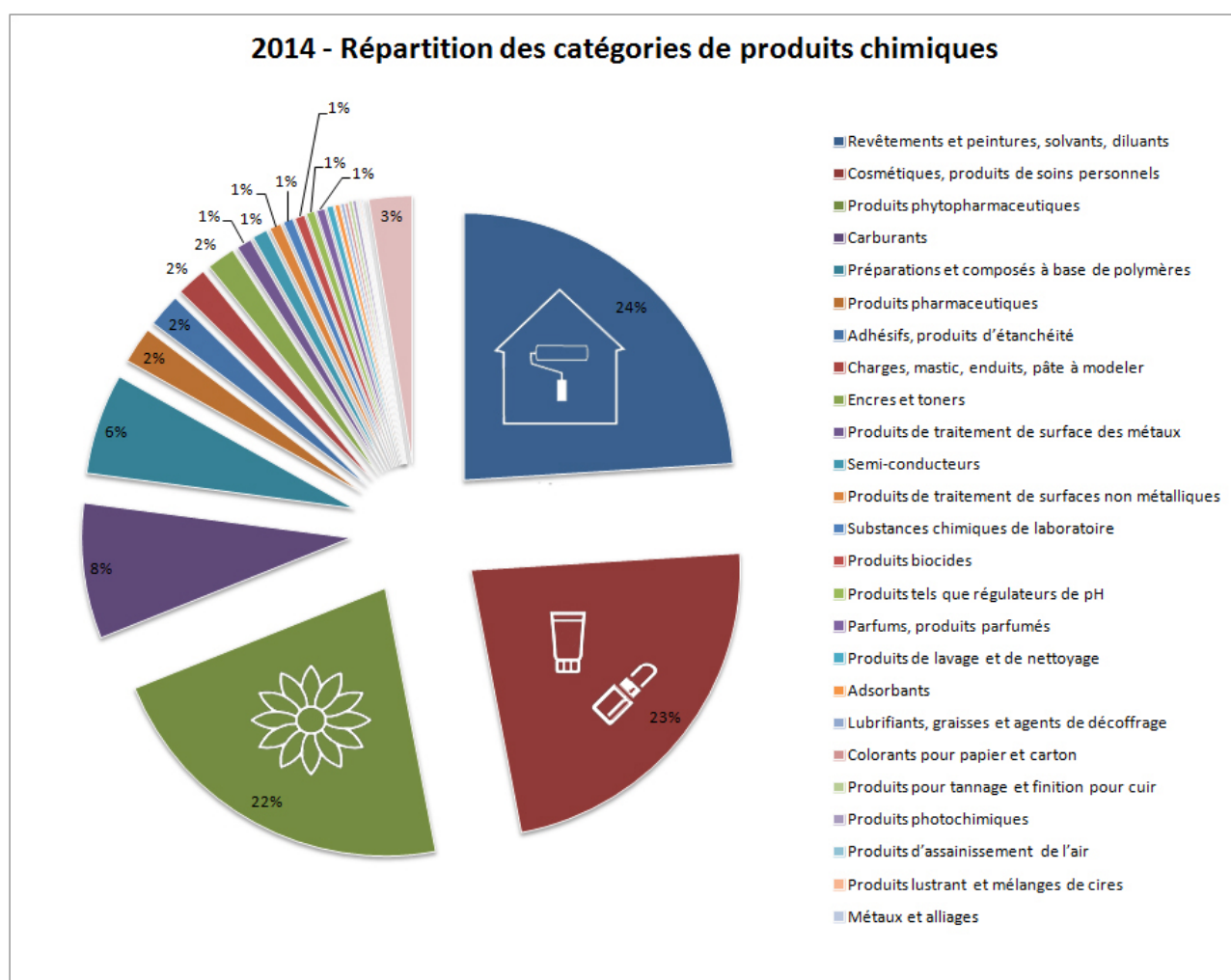


Production

Mettre en œuvre des nanotechnologies dans le domaine des matériaux passe souvent par l'incorporation de nanoparticules, c'est-à-dire des morceaux de matière ayant au moins une dimension de l'ordre du nanomètre. Elles peuvent être produites par des processus naturels ou non intentionnellement par l'homme, comme lors d'une combustion. Désormais, l'industrie les produit aussi sciemment, en grandes quantités : on parle alors de nanoparticules manufacturées. On tire parti de leurs propriétés en les incorporant dans des matériaux en volume ou juste en surface.

Champ d'expérimentation et de recherche dans le monde entier depuis une vingtaine d'années, les

nanomatériaux ne se confinent plus aux seuls laboratoires. Leur champ d'application intéresse déjà une grande diversité de produits appelée à s'étendre dans des secteurs aussi variés que le bâtiment, l'automobile, l'emballage, la chimie, l'environnement, l'énergie, la santé, la cosmétologie, l'alimentation, etc. Qu'elles soient naturelles ou non, les nanoparticules font déjà partie de notre vie quotidienne. En 2013, le site américain du « projet sur les technologies émergentes » recensait plus de 1600 produits de consommation courante contenant des nanoparticules³. Parmi les nanoparticules dont on parle le plus dans l'inventaire, l'argent dans 383 produits, le dioxyde de titane dans 179 produits, le carbone dans 87 produits. Depuis 2013, en France, l'importation ou la fabrication de nanoparticules doit être déclarée⁴. Le premier exercice annuel d'inventaire a ainsi permis d'identifier les nanoparticules les plus produites et importées sur le territoire national : le noir de carbone (274 000 tonnes), la silice (155 000 tonnes), le dioxyde de titane (15 321 tonnes)⁵. Ces deux approches sont complémentaires. Le premier type d'inventaire met en avant les nanoparticules « qui font parler d'elles » par exemple pour des raisons de marketing (ce qui est très différent de la quantité incorporée ou du nombre d'unités vendues), le second concerne les nanoparticules mises sur le marché français au-delà d'un seuil fixé réglementairement.



*Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire
(d'après le rapport d'étude 2014 publié par la Direction générale de la prévention des risques – MEDDE)*

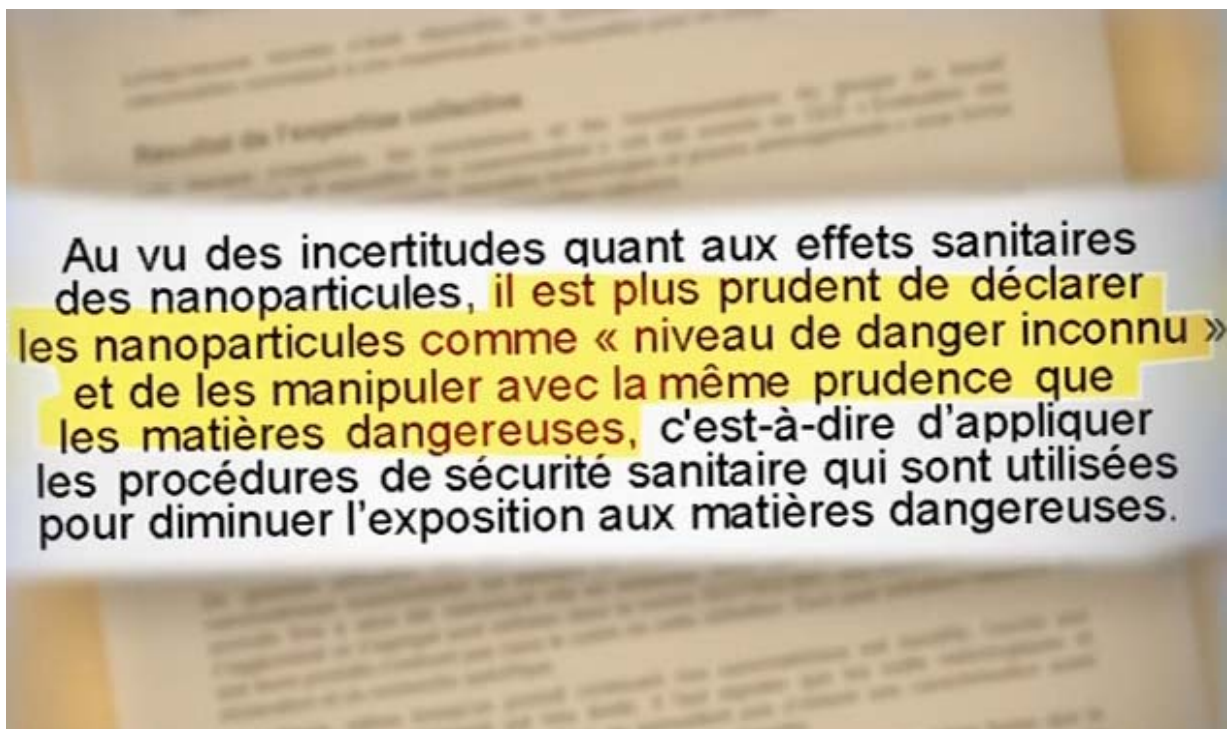
³ <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>

⁴ Voir encadré R-nano, pp. 46-47.

⁵ http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_public_format_final_20131125-2.pdf

Risques émergents et inquiétudes

Au début des années 2000, alors que les nouvelles propriétés qu'exhibent ces nanoparticules faisaient l'objet d'un discours parfois enthousiaste, des inquiétudes se manifestent. Se pose ainsi la question de la possible toxicité des composés nanos. Puisque les propriétés des substances massives ne sont pas directement transposables aux formes nanométriques, il peut en être de même quant à leurs effets biologiques. Le cas de l'amiante est là pour sensibiliser les acteurs aux risques que peut faire courir l'usage de matériaux sous une forme très divisée. Face à l'absence de données fiables, l'Agence⁶ recommandait, dès juillet 2006, pour la protection des personnes exposées (notamment les employés des industries productrices et utilisatrices de nanomatériaux) « de déclarer les nanoparticules comme "niveau de danger inconnu" et de les manipuler avec la même prudence que les matières dangereuses, c'est-à-dire d'appliquer les procédures de sécurité sanitaires qui sont utilisées pour diminuer l'exposition aux matières dangereuses »⁷.



En parallèle, la recherche sur les effets des nanos sur l'environnement et la santé se développe. Parmi les conclusions qui se dégagent depuis une dizaine d'années, il est possible de citer :

- Des études *in vivo* (sur l'animal), souvent réalisées à forte dose d'exposition, qui ont montré des effets biologiques, par exemple des réactions inflammatoires.
- On fait également le lien entre des travaux sur la pollution atmosphérique, qui montrent un effet néfaste pour la santé des particules « ultrafines » en suspension dans l'air.
- De même des expériences, *in vitro*, sur des cultures de cellules montrent que des nanoparticules peuvent être toxiques. Par exemple, elles endommagent l'ADN ou provoquent la libération de substances oxydantes à l'intérieur de certaines cellules.

⁶ Il s'agissait alors de l'Afsset. L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été créée le 1er juillet 2010 par la fusion de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) et de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset).

⁷ *Les nanomatériaux, effets sur la santé de l'homme et l'environnement*, Avis et rapport de l'Afsset, juillet 2006.

De nombreux travaux semblent contradictoires. On prend alors conscience que le problème est plus complexe que celui des substances chimiques. Tout d’abord, les résultats de tests toxicologiques peuvent dépendre des protocoles utilisés, par exemple la manière de disperser les nanoparticules dans le liquide utilisé pour contaminer un échantillon biologique. D’autre part, une nanoparticule, issue d’un matériau donné, peut avoir des effets variés selon sa taille, sa structure cristalline, la présence d’impuretés, le fait qu’elle soit ou non recouverte d’une couche protectrice. De plus, suivant le milieu où elles sont immergées, les nanoparticules peuvent avoir tendance à se coller ensemble pour former des agrégats qui ne sont plus nanométriques. Tout ceci pousse une partie des chercheurs à travailler avec de « vraies » nanoparticules, c’est-à-dire celles issues du commerce ou avec des particules de référence que les équipes de recherche peuvent se procurer pour travailler dans des conditions comparables.

On évoque de plus en plus leur capacité de translocation, c’est-à-dire que leur petite taille leur permet de se déplacer dans l’organisme, de franchir les barrières tissulaires naturelles (ex. passage des alvéoles pulmonaires vers le sang ou entre le sang et le cerveau). De même, on observe que des nanoparticules peuvent pénétrer dans les cellules.

Pendant ce temps, les conclusions des experts se font plus catégoriques. Selon eux, en 2008, il n’est pas possible d’exclure l’existence d’effets sanitaires sur l’homme, ni de conséquences sur l’environnement à la suite d’une exposition à des nanomatériaux. L’Agence préconise alors de créer une base de données qui aurait pour objet de recenser les types et quantités de nanomatériaux utilisés, le nombre de travailleurs potentiellement exposés et les moyens de prévention mis en place⁸. La traçabilité est donc indispensable pour :

- Recenser les personnels travaillant au contact des nanomatériaux et surveiller leurs conditions de travail ;
- Améliorer les connaissances sur les principales utilisations de nanomatériaux sur le territoire français.

Cette dernière préconisation devait trouver un écho avec la loi dite « Grenelle II » du 12 juillet 2010 », qui a instauré un régime obligatoire de déclaration des substances « à l’état nanoparticulaire »⁹. Il y a également des évolutions au niveau européen. C’est en effet à ce niveau que sont établies les réglementations portant sur la sécurité des produits commercialisés. Pour les substances chimiques, la réglementation adoptée en 2006 est REACH¹⁰. La stratégie retenue en 2012 consiste à prendre en compte les nanoparticules dans ce même règlement, moyennant certaines adaptations. Les premiers dossiers d’enregistrement sont en cours d’évaluation.

À ce jour, l’évaluation scientifique des risques liés aux nanomatériaux reste difficile. Le dernier état des lieux des connaissances de l’Anses, publié au mois de mai 2014, sur les enjeux sanitaires et environnementaux des nanomatériaux manufacturés, permet de préciser les connaissances scientifiques et met en évidence des effets toxiques de certains nanomatériaux sur des organismes vivants et sur l’environnement. Mais il souligne aussi la complexité à appréhender les diverses situations d’exposition pour l’homme et l’environnement, ainsi que les limites des méthodologies existantes en matière d’évaluation des risques. C’est dans ce contexte que l’Agence recommandait, en 2014, la mise en place d’outils pour mieux maîtriser les risques, en commençant par un encadrement réglementaire renforcé au

⁸ *Effets sur la santé des travailleurs exposés aux nanomatériaux manufacturés*, Avis et rapport de l’Afsset, juillet 2008.

⁹ Voir pp. 47-48.

¹⁰ Acronyme anglais pour « *Registration* »: Enregistrement, de toutes les substances produites ou importées à plus d’une tonne par an, sous 11 ans, « *Evaluation* »: Evaluation des propositions d’essais, des dossiers et des substances par les Etats-membres ou l’Agence, « *Authorization* »: Autorisation, pour les substances extrêmement préoccupantes, Restrictions, pour gérer les risques liés à d’autres substances, « *of Chemicals* »: des produits chimiques.

niveau européen.

Depuis quelques années, les projets de recherche ont évolué, notamment pour prendre en compte les difficultés évoquées ci-dessus.

- De plus en plus souvent, un effort important est fait pour caractériser les nanoparticules, en utilisant des procédés complémentaires parfois nombreux. Cette caractérisation se fait souvent dans le milieu biologique, c'est-à-dire qu'on analyse les nanoparticules telles que vues par la culture de cellules. Cela a été rendu possible par la démocratisation de certains équipements, mais aussi la constitution d'équipes pluridisciplinaires.
- De même, souvent, différentes lignées cellulaires sont testées en parallèle, pour obtenir des résultats de portée plus générale.
- Des moyens parfois sophistiqués sont mis en œuvre (nanotubes radio marqués, utilisation d'isotopes, utilisation du rayonnement synchrotron).
- Plusieurs études visent à dépasser la période de débroussaillage passée. Elles visent à donner des résultats utilisables pour statuer sur le risque : mise au point de tests haut débit, utilisation de particules du commerce, analyse de l'exposition en conditions réelles.

Comment observer les nanoparticules ?

Le **microscope électronique** est capable de fournir des images de très haute résolution – le grossissement permet de voir l'échelle atomique ; un microscope optique permet de voir des objets plutôt 1000 fois plus gros. La différence est que le microscope électronique utilise un faisceau d'électrons et des lentilles magnétiques pour imager un échantillon alors que le microscope optique utilise un faisceau de lumière et des lentilles de verre. Il existe différentes sortes de microscopes électroniques :

- Le **microscope électronique à transmission** (MET), mis au point en 1931 par Max Knoll et Ernst Ruska¹¹, mesure un faisceau électronique « transmis » à travers un échantillon très mince. L'image obtenue résulte ainsi de l'interaction entre les électrons et l'échantillon. On obtient des images avec une finesse meilleure que le dixième de nanomètre.
- Le **microscope électronique à balayage** (MEB) qui, en balayant la surface d'un objet, peut donner des informations sur le relief de la surface ; La finesse des images est moins bonne mais il permet d'observer des objets comme s'ils étaient en trois dimensions.

Un autre dispositif est le **microscope à force atomique inventé en 1985**. Il permet d'imager une surface avec une résolution d'une dizaine de nanomètres.

Ces dispositifs sont précieux et souvent irremplaçables pour caractériser des nanoparticules.

¹¹ Prix Nobel de physique en 1986.

La mobilité des risques « nanos »

La mobilité des risques « nanos » - Mobirisques

Patrick CHASKIEL

Mots-clés : controverses, industrialisation, mobilité, nanos, pratiques, précaution, risques, sécurité

Depuis les années 1960, le paysage industriel se transforme en Europe avec la déstructuration de l'industrie héritée de la fin du XIX^e siècle (mines et textile, puis assemblage et sidérurgie, plus récemment pétrochimie ...). Se dessine un nouveau modèle économique qui vise à développer une industrie de substitution, fondée sur l'innovation et la haute technologie. L'approche des risques liés à ces nouvelles activités diffère de celle des risques technologiques et industriels classiques, qui portait sur des risques connus (ex. pollutions, risques accidentels...) mais aussi « *situables* » tout au long des phases de production.

Cette différence marque le cas des « nanos », pour lesquelles on peut citer un certain nombre de caractéristiques :

- Une définition débattue. Certes, il est possible de parvenir à un énoncé scientifique relativement simple : les nanoparticules sont constituées essentiellement d'atomes « de surface » du fait de leur petite taille et de leur réactivité. Elles ont généralement des propriétés différentes du même matériau lorsque celui-ci n'est pas de dimension nanométrique (on peut employer le terme de matériau « massif » pour décrire cette situation). Il s'ensuit que la modification des propriétés en fonction de la taille est liée à de nombreux paramètres, mais essentiellement à la nature et aux propriétés intrinsèques des atomes qui composent la nanoparticule. Dans la réalité, il n'existe pas de limite universelle en dessous de laquelle une particule devient une « nanoparticule ».

- Classiquement, le traitement des risques associés aux produits et procédés est fondé sur le principe d'une « situation » des risques (sites industriels, par exemple). Avec les nanomatériaux émerge – ou est susceptible d'émerger – un type de problème particulier, celui de la mobilité des risques, incluant leur transformation tout au long du cycle de vie des produits les intégrant.
- Les outils actuels d'évaluation de l'exposition des travailleurs normalement utilisés sont mal adaptés à l'application aux nanoparticules en milieu de travail (mesures de formes, de taille, effets de surface, agglomérations, évolutions dans le temps, etc.), alors que les quelques données disponibles suggèrent que les expositions peuvent être substantielles lors de la manipulation à l'air libre. Pour autant, les relations exposition-effets sur « environnement-santé » ne sont, pour l'essentiel, pas connues. Cette complexité s'ajoute à l'absence de consensus des experts institutionnels et d'entreprises sur l'à-propos de la réglementation existante.

Paradoxalement, des nanomatériaux sont produits sans que leurs effets sur l'environnement et la santé ne soient connus. Chaque nanotube de carbone possède, par exemple, des propriétés différentes en fonction de sa taille et/ou de sa structure ; le champ des possibles est sans limites apparentes. D'autre part, bien que certaines pratiques soient déjà anciennes (ex. production et inclusion de nanoparticules dans les cosmétiques et les peintures) on sait encore peu de choses sur la gestion des

risques en vigueur dans les entreprises, que ce soit des « start-ups », intermédiaires entre le laboratoire et l'opérateur industriel, ou des usines. Mais, en l'absence de traçabilité, qu'en est-il de la mobilité des nanoparticules le long du cycle de vie du produit, qui passent d'une industrie à une autre, de la fabrication à l'inclusion, pour aller jusqu'à la déchetterie en changeant éventuellement de propriétés et/ou de comportements ?

“ *Le développement incomplet des modalités de contrôle externe des risques « nanos » tout au long du cycle de vie ... ne répond pas, ou pas encore, aux exigences d'une gestion globale des risques.* ”

Le projet de recherche : Mobirisques

Le projet Mobirisques (mobilité des risques « nanos ») a permis de traiter différentes questions liées à la thématique des « nanos ».

Faut-il absolument une définition des nanos ?

Il s'agissait ainsi d'interroger la pertinence d'une définition des substances à l'échelle nanométrique et, plus généralement, des nanomatériaux du point de vue de la gestion des risques environnement-santé. Ce travail a pris la forme d'un séminaire interne très interdisciplinaire ou, plutôt inter-sciences : Droit, Génie des procédés, Information-communication, Psychologie sociale, Sciences des matériaux, et d'une recherche de terrain à partir d'enquêtes de type sociologique.

La conclusion de ce travail est que l'absence d'une définition scientifique des nanoparticules et nanomatériaux n'est pas rédhibitoire pour étudier s'ils présentent ou non un risque pour la santé ou, plus largement, pour l'environnement. Ainsi, il n'est pas nécessaire d'avoir une définition formelle des nanomatériaux pour responsabiliser, pénalement et civilement, les producteurs. En effet, les nanomatériaux peuvent être « objet de droit », même

en l'absence de définition scientifique, à travers des incidences qui leur sont prêtées. Le droit construit alors un double juridique à partir de certaines caractéristiques utiles à la réalisation de l'objectif fixé par la réglementation envisagée, ou bien range l'objet, sans être obligé de le définir, dans une catégorie préexistante, accompagnée d'un régime juridique précis.

Où mène l'étiquetage ?

De même, si la procédure d'étiquetage se présente comme un compromis susceptible de dépasser des désaccords sur le devenir des nanomatériaux, cette procédure est une source potentielle de nouvelles tensions. Les problématiques laissées sous silence par la démarche d'étiquetage demeurent, en particulier celles relatives aux choix technologiques. En d'autres termes : « était-il vraiment nécessaire de faire le choix des nanotechnologies pour ce produit ? Pour quels usages ? ». Du coup, loin d'éteindre la controverse sur les « nanos », la démarche d'étiquetage ne fait que la déplacer en ouvrant de facto d'autres sujets possibles de controverses, autour de la difficulté juridique d'invoquer « le risque de développement », par exemple.

Quelles pratiques de contrôle de l'État ?

De la recherche de terrain ressort un *décalage* entre, d'un côté, l'idée, relativement partagée, d'une prise en compte du cycle de vie des produits et, de l'autre, l'exercice d'un contrôle effectif, par l'État et ses services, de la gestion de la chaîne des risques. Autrement dit, le développement incomplet des modalités de contrôle externe des risques « nanos » tout au long du cycle de vie, donc aussi l'absence de continuité entre les différentes phases concernées ne répondent pas, ou pas encore, aux exigences d'une gestion globale des risques « nanos ». Ce décalage tient, notamment, au fait que les administrations d'Etat sont très inégalement investies en régions, faute d'un message structuré et clair (environnement, santé) ou en raison du manque de coopération des entreprises avec les agents de contrôle (travail). Il relève également de la difficulté, tant pour les agents de contrôle que pour les médecins du travail, à s'emparer de la problématique des nanomatériaux, compte tenu de sa complexité et du manque de collaboration entre « contrôlés » et « contrôleurs ».

Une concurrence entre risques ?

Des recherches menées, il résulte aussi que, loin de s'agréger aux autres, le thème des nanomatériaux peut entrer en concurrence avec des thèmes de risques « plus simples », c'est-à-dire plus visibles et pour lesquels des indicateurs de résultat peuvent être estimés, en termes quantitatifs (chutes d'échelle, par exemple), avec des temporalités courtes. De même, la sortie pratique du problème de l'amiante, particulièrement durable dans certaines régions, peut mobiliser l'essentiel des énergies et, paradoxalement, entrer en concurrence avec l'effort nécessaire à la prise en compte des nanomatériaux, alors même que les risques associés à l'amiante sont réputés avoir largement contribué, dans les controverses, à la construction d'un problème « nanos ». Cette question de la « concurrence des risques », qui reste à étudier finement, prend un sens d'autant plus fort que le chaînage des risques est, à la fois, revendiqué par la société civile et admis par les institutions. Elle se manifeste d'autant plus qu'elle traverse plusieurs institutions, dont la coordination s'avère nécessaire.

Les partenaires :

Patrick Chaskiel

CERTOP, UMR 5044, CNRS, Université Toulouse Le Mirail, Université Paul Sabatier-Toulouse 3

Stéphanie Lacour

CECOJI, FRE 3500 CNRS-Université de Poitiers/Ivry

Valérie Le Floch

UMR 5263, CNRS, Université Toulouse Le Mirail

Emmanuel Flahaut

CIRIMAT/LCMIE, UMR 5085, CNRS, Université Paul Sabatier, Institut National Polytechnique de Toulouse

Isabelle Poirot-Mazères

Institut Maurice Hauriou, EA 918, Université Toulouse-Capitole

Jean-Claude André

LRGP UMR 7274 CNRS, Université de Lorraine, Nancy

Durée : 18 mois

Financement : 29640 €

Contact : patrick.chaskiel@univ-tlse3.fr

Vers un matériau modèle en nanotoxicologie ?

Toxicologie des nanotubes d'imogolite, vers un matériau modèle en nanotoxicologie ?

Dr Jérôme ROSE

Mots-clés : agrégation, imogolite, nanotubes modèle, synthèse, toxicologie

Popularisés dans le monde de la recherche dans les années 1990 par les travaux de Sumio Iijima, les nanotubes de carbone (NTC) ont suscité un enthousiasme énorme, en raison de leurs propriétés exceptionnelles. Légers comme le plastique, plus résistants que l'acier, conducteurs électriques, ils permettent d'envisager de multiples applications, parmi lesquelles des matériaux, divers appareils électroniques, de nouveaux médicaments. Néanmoins leur forme très similaire à celle de l'amiante a soulevé des inquiétudes et le débat ; inquiétudes que l'on peut généraliser à l'ensemble des nanofibres.

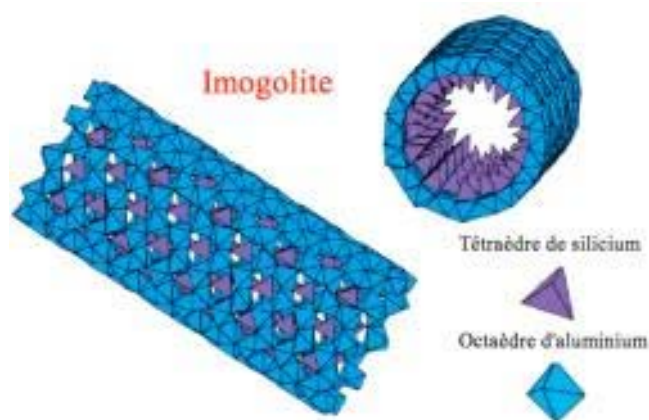
Les nanotubes de carbone représentent une vaste famille d'objets. Ils varient en fonction de leur longueur mais surtout de la structure de leurs parois. Ces variations sont rendues possibles grâce aux différents catalyseurs métalliques utilisés et bien sur les modes de fabrication. On distingue ainsi :

- Les nanotubes de carbone simples avec une seule paroi (SWNT)
- Les nanotubes de carbone multi - parois (MWCNT)

Une des difficultés majeures associées à l'usage des nanotubes de carbone réside dans la synthèse de produits homogènes en taille et structure. Les synthèses aboutissent généralement à des mélanges de tubes, ayant des impuretés métalliques (catalyseurs). Cette très forte variabilité de composition et de forme ne permet pas de déterminer sans ambiguïté les paramètres à l'origine d'effets toxiques (longueur, diamètres, structure de la paroi, impuretés...).

Les nanotubes d'imogolite

Il existe de nombreuses autres sortes de nanotubes et de nanofibres qu'on appelle de manière générale « HARN »¹². Un exemple est celui de l'imogolite, minéral naturel qui se présente sous forme de nanotubes de 2 nm de diamètre et plusieurs microns de long. Du point de vue chimique, il s'agit d'un aluminosilicate, comme les argiles. La surface externe du tube est composée d'octaèdres¹³ d'aluminium alors que la couche interne est constituée de tétraèdres de silicium. Découverte par Yoshima et Aomine en 1962 grâce à la microscopie électronique, l'imogolite résulte de l'altération d'un sol volcanique¹⁴ ; Elle peut également être synthétisée. Il s'agit d'ailleurs de la première structure nanotubulaire à avoir été synthétisée puisqu'elle a été obtenue pour la première fois en 1977¹⁵.



(Source : J. Rose CEREGE-CNRS)

L'industrie les utilise depuis plus de 15 ans (production de plusieurs dizaines de tonnes par an comme produit anti-électrostatique, matériel de filtration, stabilisateurs d'encre dans les papiers, etc...).

CEREGE UMR 7330 CNRS, Aix Marseille Université, Aix en Provence

¹² HARN pour « High Aspect Ratio Nanomaterials », c'est-à-dire nanomatériaux à fort rapport d'aspect (longueur/diamètre).

¹³ Un atome d'aluminium entouré de 6 atomes d'oxygène qui forment les sommets d'un octaèdre.

¹⁴ Dans une fraction argileuse d'un « glassy volcanic ash soil » au Japon.

¹⁵ La synthèse des premiers nanotubes de carbone (NTC) date de 1991 et celle du premier nanotube inorganique de 1992.

Le projet de recherche : Nanotox-IMO

Le projet Nanotox-IMO s'inscrit dans ce contexte global de la compréhension des mécanismes de toxicité des HARN. Les nanotubes présentent l'inconvénient d'être difficiles à produire sous une forme bien définie, ce qui peut limiter la portée de conclusions de travaux sur leur toxicité. L'idée sous-jacente est que les partenaires du projet ont développé la capacité de fabriquer de l'imogolite de manière très reproductible, sans impureté, simple et double paroi, ce qui en fait potentiellement un matériau de choix pour ces études de toxicité.

“ Les nanotubes présentent l'inconvénient d'être difficiles à produire sous une forme bien définie, ce qui peut limiter la portée de conclusions de travaux sur leur toxicité. ”

Le projet vise deux objectifs :

- Contribuer à la caractérisation de la toxicité des nanotubes d'imogolite ;
- Étudier les paramètres de ces nanotubes qui gouvernent leur toxicité (inflammation, biopersistance, fibrose, génotoxicité).

Pour cela, des nanotubes d'imogolite devaient être synthétisés avec des caractéristiques bien contrôlées. En utilisant ces nanotubes parfaitement calibrés, il s'agissait d'explorer la pertinence de l'emploi d'imogolite en nanotoxicologie et surtout, la possibilité d'extrapoler ou pas les résultats obtenus avec l'imogolite à d'autres nanotubes.

Résultats

Le premier volet du projet consistait à synthétiser des nanotubes d'imogolite de longueur micronique à forte concentration¹⁶. Il a fallu comprendre le mécanisme de croissance des tubes puis repenser en profondeur des protocoles de synthèse. Le projet a permis de démontrer que la croissance des nanotubes se fait par « agrégation », c'est-à-dire qu'un tube croît lorsqu'un autre se « colle » à l'une des deux extrémités. La vitesse de croissance dépend donc du nombre de collisions « favorables » entre tubes. Au début, il y a de nombreux petits tubes et la probabilité de contacts favorables est élevée. Mais, lorsque les tubes se collent entre eux, le nombre de « bouts disponibles » diminue et la probabilité de collage s'effondre. La stratégie qui a été adoptée a consisté à maximiser la probabilité de rencontre et surtout à augmenter l'efficacité du collage des tubes.

Ce résultat est sans doute inédit. Qui plus est, cette synthèse est reproductible – ce qui permet d'utiliser les nanotubes d'imogolite comme matériau modèle en nanotoxicologie. Ces premiers lots d'imogolite ont permis de tester quelques hypothèses sur les mécanismes de toxicité des HARN, et ont fait l'objet de publications scientifiques :

- *In vitro* : tous les essais de cytotoxicité sur cellules J774 (lignée de macrophages murins) et sur différentes lignées cellulaires montrent une toxicité cellulaire de l'imogolite seulement à hautes concentrations¹⁷ ;
- *In vivo* : l'étude de la biopersistance¹⁸ chez le rat montre que 20% de la dose administrée persiste dans les poumons à la fin de l'expérience, soit 60 jours après exposition. Cela apparaît à la fois pour les tubes simples et à double paroi. À noter que la réponse

¹⁶ Les protocoles permettant d'atteindre des nanotubes de longueur quasi micronique existaient, mais ces protocoles ne fonctionnaient qu'à très faible concentration, ne permettant pas de produire des quantités suffisantes pour des études de toxicologie.

¹⁷ 10⁻¹ g/L ou 100 µg/mL et au-delà.

¹⁸ Durée pendant laquelle le tube reste dans l'organisme.

inflammatoire est dose-dépendante 3 jours après l'administration des nanotubes d'imogolite. Et l'inflammation pulmonaire persiste au moins pendant 2 mois.

Ce projet a ainsi permis d'ouvrir une nouvelle voie de recherche, que les partenaires poursuivent dans le cadre de collaborations internationales.

Les partenaires :

Jérôme Rose

CEREGE UMR 7330 CNRS, Aix Marseille Université, Aix en Provence

Dominique Lison

Louvain Centre for Toxicology and applied Pharmacology (LTAP), Université catholique de Louvain, Belgique

Emmanuel Doelsch

UR recyclage et risque Cirad, CEREGE, Aix en Provence

Antoine Thill

Lions UMR 3299 CEA/CNRS SIS2M, Saclay

Alain Botta

LBME (Biogénotoxicologie et Mutagenèse environnementale, EA 1784), Université de la Méditerranée, Marseille

Durée : 24 mois

Financement : 152 K€

Contact : rose@cerege.fr

L'abrasion de nanomatériaux

Obtention de données sur l'abrasion de nanomatériaux

Christophe BRESSOT

Mots-clés : abrasion, céramiques antibactériennes, débris, dioxyde de titane, émissions, peintures, pneus, relargage, revêtements, silice, usure

L'inclusion de nanoparticules peut conférer des propriétés nouvelles à des matériaux ou à des revêtements. Ainsi, certaines d'entre elles, comme la silice, renforcent des polymères comme le caoutchouc. D'autres comme le dioxyde de titane (TiO_2) ont la propriété d'absorber le rayonnement ultraviolet. Le dioxyde de titane est de plus photocatalytique, c'est-à-dire qu'activé par le rayonnement ultraviolet, il peut décomposer des molécules de polluants. Les nanoparticules sont de plus en plus couramment utilisées. Par exemple :

- dans le domaine des transports, on peut évoquer le cas des chaussées rendues dépolluantes par l'ajout de dioxyde de titane, ou l'incorporation de nanoparticules d'oxyde de silice dans les pneus pour réduire la résistance au roulement ;
- dans le domaine du bâtiment, des matériaux ou des peintures incorporant du dioxyde de titane pour les rendre « auto-nettoyants », ou de l'oxyde de cérium pour augmenter leur résistance aux ultraviolets ;
- en milieu hospitalier, on utilise dans le cadre de la lutte contre les infections nosocomiales, des carrelages contenant une nano-charge en vue de conférer aux matériaux des propriétés antibactériennes.

D'un côté, ces applications sont très prometteuses. De l'autre, nous ignorons quel est le devenir des nanoparticules, une fois incorporées dans ces matériaux. Beaucoup subissent diverses agressions. Quelle est notamment, leur résistance à l'abrasion ?

Pourtant, la mise en application du décret N° 2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire¹⁹ donne lieu à une synthèse annuelle des déclarations²⁰ mettant en évidence un usage intensif de ces nanomatériaux.



Le cycle de vie des matériaux

On soupçonne que, lorsqu'ils sont soumis à une sollicitation mécanique (comme les sols, les pneus) ou aux intempéries (revêtements de façade), certains nanomatériaux émettent des nanoparticules dans l'environnement, avec pour conséquences des risques sanitaires non encore évalués. L'évaluation de ces émissions nécessite d'être mieux documentée, d'autant plus que le dioxyde de titane (couramment

Ineris, Verneuil en Halatte

¹⁹ Pris en application de l'article L. 523-4 du code de l'environnement.

²⁰ http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/Rapport_public_format_final_20131125.pdf

employé) est classé cancérigène possible pour l'homme (catégorie 2B) par le Centre international de recherche sur le cancer (Circ)²¹ - des études ayant démontré l'apparition de cancers du poumon chez l'animal. Les débris d'usure des matériaux de construction incluant des nanoparticules notamment de dioxyde de titane, sous forme de revêtement de surface ou dans la masse pose donc la question de l'innocuité de ces produits.

“ *On soupçonne que, lorsqu'ils sont soumis à une sollicitation mécanique ou aux intempéries, certains nanomatériaux émettent des nanoparticules dans l'environnement.* ”

Le projet de recherche : Nano-Data

Des premiers travaux de l'Ineris²² ont mis en évidence différents processus d'altération pouvant engendrer un relargage éventuel à partir de nanomatériaux dans les milieux aériens et aqueux (ex. abrasion humide, lessivage...). Ce projet qui élargit la démarche, porte sur un ensemble de matériaux actuellement utilisés et contenant des nanoparticules. Certains d'entre eux sont mis en œuvre en air intérieur (ex. céramiques et peintures dépolluantes dopées au TiO₂) et d'autres à l'extérieur des bâtiments (revêtements de façade dopés au TiO₂, revêtements routiers dopés au TiO₂, lasures²³ dopées au CeO₂...). Les tests ont porté sur des matériaux qu'on trouve dans le commerce. Il a parfois fallu les adapter pour qu'ils puissent être utilisés dans des tests. Pour mieux comprendre la manière dont le dioxyde de titane était émis dans le cas des carreaux, nous avons reproduit une partie du procédé d'imprégnation utilisé par le fabricant pour générer un dépôt en surface en faisant varier le nanomatériau, la concentration et le nombre de couches.

Pour caractériser la capacité de ces matériaux à émettre des nanoparticules lorsqu'ils sont abrasés en condition d'usage normal, on a utilisé des machines simulant des frottements dans des conditions réalistes, de manière automatisée et dans des conditions contrôlées. Ces mêmes machines sont utilisées dans l'industrie pour tester les performances de certains matériaux vis-à-vis de l'abrasion. Il est également prévu de placer les matériaux à tester dans des chambres simulant de manière accélérée l'effet du soleil et des intempéries par un éclairage UV, et des cycles de température (humidité). Les particules émises durant les tests d'abrasion sont analysées par une batterie d'appareils :

- certains mesurent la concentration de particules dans l'air autour du matériau abrasé en fonction de la taille dans une gamme allant de 4 à 20 000 nanomètres ;
- un microscope électronique à transmission permet de faire l'image de certaines de ces particules piégées sur une grille trouée. Il est couplé à un système informatisé qui permet de traiter un grand nombre d'images et de faire ainsi des analyses puis un dénombrement des nanoparticules observées. D'autre part, ce microscope permet d'analyser la composition chimique des particules et, en particulier, de détecter la présence de titane. Cela permet de différencier les nanoparticules de TiO₂ libérées de fragments du matériau massif arrachés par abrasion.

Un premier ensemble d'expérimentations a été réalisé. Pour citer quelques résultats :

- La présence de revêtements de façade, peintures et lasures, permet une meilleure résistance à l'abrasion car ces couches déposées en surface des matériaux protègent de l'usure. Les particules émises ont généralement des dimensions situées entre

²¹ Les monographies du Circ : <http://monographs.iarc.fr/indexfr.php>

²² Institut national de l'environnement industriel et des risques : www.ineris.fr

²³ Produit appliqué sur le bois qui, contrairement aux vernis, ne crée pas de films.

100 et 500 nm. En revanche les échantillons vieillis donnent lieu dans certains cas à des émissions de nanoparticules libres.

- Des essais préliminaires sur les revêtements suggèrent que cette couche vieillit. La plupart du temps, on observe durant l'abrasion une émission de particules submicroniques²⁴ et peu de nanoparticules libres, sauf quand la couche appliquée vieillit ;
- Pour les carrelages commerciaux dopés au TiO₂ on observe une émission accrue de nanoparticules par rapport à des carreaux commerciaux non dopés, mais celle-ci est probablement due au fait que les carreaux dopés sont modifiés en surface pour les rendre plus rugueux et donc plus émissifs lors d'une abrasion. Là aussi l'émission est principalement formée de particules submicroniques avec quelques particules nanométriques ;
- Les particules arrachées par le frottement des pneus aux revêtements routiers dopés au TiO₂ sont principalement microniques.

Les travaux s'orientent désormais sur des essais pratiqués sur des matériaux vieillis.

Les partenaires :

Christophe Bressot

Ineris, Verneuil en Halatte

Cécile Pagnoux

ENSCI, CEC, Limoges

Pierre Horny

Ifsttar, Centre de Nantes – Bouguenais

Martin Morgeneier

Laboratoire TIMR, Centre de Recherche Roberval,
Université de Technologie de Compiègne

Durée : 42 mois

Financement: 166.608 €

Contact : Christophe.BRESSOT@ineris.fr

²⁴ C'est-à-dire de taille variant entre 200 et 1000 nanomètres.



Les effets des particules d'oxydes métalliques sur le poumon

Mesures des effets toxicologiques de nano-oxydes métalliques sur cellules humaines in vitro

Sylvie CHEVILLARD

Mots-clés : criblage, dioxyde de titane, oxyde de silicium, oxydes métalliques, pathologies pulmonaires, poumon

De plus en plus de produits contiennent des nanoparticules à base d'oxydes métalliques, qui ont été intégrées pour conférer des propriétés nouvelles à un matériau (ex. colorant, traitement de surface...). D'autre part, des applications sont en développement dans le secteur de la santé (ex. biocapteurs, vectorisation de médicaments...).

Les travailleurs mettant ces particules en œuvre, les consommateurs, les patients y sont donc potentiellement exposés, notamment par inhalation. Or, des premières études sur les effets des nanoparticules montrent que les méthodes de défense « classiques » de l'appareil respiratoire, comme la toux par exemple, ne sont pas efficaces contre les nanoparticules. De plus, celles-ci pénètrent plus facilement jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Des publications²⁵ ont montré un possible lien entre pathologies pulmonaires et exposition aux nanomatériaux, mais elles ont été critiquées en raison de la faiblesse statistique des populations analysées. De même, les études *in vitro* sur des lignées pulmonaires humaines sont encore peu nombreuses et parcellaires.

Il est donc nécessaire de développer des tests de toxicité fiables pour ces nanoparticules. Cela peut s'avérer complexe. En effet, chaque nano-objet doit être considéré comme spécifique et singulier²⁶. Dans un avis concernant « *Les risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et dans*

l'environnement » (publié le 24 mars 2010), l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset, actuelle Anses) précisait qu'« *avec les nanomatériaux, il est impossible d'en rester aux généralités. Il faut les examiner au cas par cas, produit par produit, usage par usage (...) Selon la formulation et la matrice où il est incorporé, chaque nanomatériau acquiert une réactivité et un comportement différents* »²⁷.

Comment identifier, comprendre et évaluer les dangers des nanoparticules d'oxydes métalliques sur des lignées pulmonaires humaines ?

Le projet de recherche : Nanomique

Le projet Nanomique est une approche de criblage systématique pour définir la toxicité d'une quinzaine de nanoparticules (déjà utilisées dans l'industrie) sur des lignées cellulaires de cancers²⁸ de poumon humain et sur des tissus pulmonaires cultivés en trois dimensions. Il s'appuie sur une plateforme de criblage (« screening ») à haut débit, c'est-à-dire un dispositif permettant d'effectuer de très nombreux tests en parallèle sur des cultures de cellules. Cette capacité est obtenue en travaillant sur des plaques avec 96 puits de moins d'un centimètre carré, contenant chacun une culture cellulaire indépendante. On peut ainsi tester rapidement différentes concentrations de nanoparticules et différents types de cellules.

CEA DSV/LCE, Fontenay-aux-Roses

²⁵ Byrne (2008) et Song (2009).

²⁶ Recommandation européenne 424 du 7 février 2008: http://ec.europa.eu/research/science-society/document_library/pdf_06/nanocode-recommandation-pe0894c08424_fr.pdf

²⁷ Disponible sur le site internet de l'Anses: www.anses.fr/fr/content/%C3%A9valuation-des-risques-li%C3%A9s-aux-nanomat%C3%A9riaux

²⁸ Le cancer rend les cellules immortelles, c'est-à-dire qu'on peut les cultiver indéfiniment donc les commercialiser pour des tests biologiques. C'est le cas des lignées de cellules mentionnées plus bas qui sont issues de tumeurs. Les cellules normales sont programmées pour ne supporter qu'un nombre fini de divisions.

Dans le cas présent, le choix a été fait de travailler sur des cultures de cellules pulmonaires, qui constituent la première cible en cas d'inhalation. Trois types ont été testés : A549 et Calu-3 qui sont deux lignées de cellules qui recouvrent les alvéoles pulmonaires humaines et 16HBE-14o- qui est issue de la paroi des bronches. Ces cellules forment des couches qui simulent la paroi d'une alvéole pulmonaire ou d'une bronche. À moyen terme, il est prévu de travailler sur des structures tridimensionnelles de cellules plus représentatives des tissus du poumon. Une partie du projet s'attache à réaliser de telles structures en 3D.

Le projet prévoit de tester des nanoparticules à base d'oxyde métallique. Dans un premier temps, deux types sont utilisés pour la mise au point des tests :

- Des particules de dioxyde de titane de 25 nanomètres disponibles commercialement. Une fois dans le milieu de cultures celles-ci s'agrègent pour former des ensembles d'une centaine de nanomètres ;
- Des particules qui pourraient être utilisées pour transporter des médicaments. Il en existe différentes versions à base de fer, de chrome ou d'aluminium.

Les doses s'expriment en quantité « saupoudrée » par centimètre carré de culture. Les tests ont été réalisés sur des cellules témoins (non exposées) et des cultures ayant reçu de 6 à 96 microgrammes par centimètre carré.

“ *Comment évaluer les dangers des nanoparticules d'oxydes métalliques sur des lignées pulmonaires humaines ?* ”

Toute une batterie de tests est prévue, visant à mesurer :

- la cytotoxicité, c'est-à-dire la capacité des nanoparticules à endommager des cellules. On mesure notamment la perméabilité de la membrane (une cellule mourante « fuit ») et les propriétés électriques des cellules ;

- la génotoxicité, c'est-à-dire la capacité des nanoparticules à endommager le génome des cellules ;
- le stress oxydant, c'est-à-dire le pouvoir des nanoparticules à libérer dans la cellule des produits oxydants capables de l'endommager ;
- la capacité des nanoparticules à pénétrer dans les cellules.

Outre la caractérisation des effets biologiques induits par des nanoparticules de différentes tailles et compositions chimique, l'analyse du transcriptome²⁹ permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire, c'est-à-dire d'identifier dans un tissu donné et dans des conditions données, les gènes actifs, d'analyser l'expression de ces gènes et de déterminer leur réseaux d'expression. À partir de ces résultats, l'objectif *in fine* du projet de recherche « *Nanomique* » est de sélectionner des nanoparticules modèles pour la réalisation d'une toxicologie exhaustive, nécessaire pour mieux suivre et protéger les travailleurs exposés.

Les partenaires :

Sylvie Chevillard

CEA DSV/LCE, Fontenay-aux-Roses

Jean-Charles Arnault et Philippe Bergonzo

CEA LIST, Gif-sur-Yvette

Patricia Horcajada Cortes et Christian Serre

Institut Lavoisier, CNRS UMR 8180, Université de Versailles, Versailles

Durée : 36 mois

Financement : 198.818 €

Contact : sylvie.chevillard@cea.fr

²⁹ Ensemble des ARN issus de la transcription du génome donc des protéines que la cellule fabrique à un instant donné.



Les effets des nanoparticules sur les neurones du centre respiratoire

Effets des nanoparticules sur l'activité et le développement des centres respiratoires

Pr. Didier MORIN

Mots-clés : barrière hémato-encéphalique, centre respiratoire, cerveau, neurones, nerfs, stress oxydant, système nerveux central, translocation

De nombreuses études ont montré l'existence d'effets multiples et variés sur la santé induits par des nanoparticules (ex. fullerènes, nanotubes de carbone, nanoparticules inorganiques et organiques). Toutefois, peu de données sont disponibles concernant les effets des nanoparticules sur le fonctionnement du système nerveux central et périphérique.

Il est clairement établi que des nanoparticules peuvent atteindre le système nerveux central. Elles sont capables de rejoindre certaines régions du cerveau ou du tronc cérébral et de s'y accumuler. Par exemple, on a observé qu'après inhalation, des nanoparticules peuvent être captées et internalisées par des terminaisons nerveuses, puis transportées le long des nerfs olfactifs et rejoindre ainsi le système nerveux central (ex. carbone 13, or colloïdal, oxyde de titane...). D'autres mécanismes de translocation pourraient participer à l'accumulation des nanoparticules au niveau des structures cérébrales. On soupçonne, par exemple, que les nanoparticules passeraient des poumons ou de l'intestin vers le sang, pour gagner ensuite le cerveau.

Même parcellaires, quelques travaux ont montré toutefois que les nanoparticules pouvaient modifier l'activité des cellules nerveuses. Par exemple, Oberdörster a rapporté que des fullerènes induisaient une peroxydation des lipides dans le cerveau du poisson. De même, Yamada a observé des effets nocifs sur certains types de transmissions de l'information d'un neurone à l'autre chez le rat.

Parallèlement, quelques données ont été obtenues à partir de modèles *in vitro* tels que les cultures cellulaires et les tranches de tissu nerveux. Des travaux menés sur la lignée cellulaire PC12³⁰ ont montré par exemple, que des nanoparticules pouvaient altérer les cellules exposées ou modifier leur fonctionnement. De plus, des effets de nanoparticules ont été étudiés sur des ensembles de neurones comme un modèle de tranche d'hippocampe³¹ de rat. Les enregistrements de l'activité électrique montrent sur certaines cellules des variations de l'amplitude de flux d'ions, flux qui sont à l'origine des propriétés électriques des neurones. Cependant, les effets de nanoparticules sur des réseaux de neurones vitaux, comme en particulier ceux commandant la respiration, restent à ce jour inconnus.

Le projet de recherche : NanoResp

L'objet principal de notre étude est de déterminer, sur la base d'approches expérimentales, chez le rat et la souris :

- L'effet d'une exposition aiguë aux nanoparticules sur l'activité des centres respiratoires localisés au niveau du tronc cérébral (ex. changements d'amplitude des activités respiratoires, variations des rythmes respiratoires) ;
- À plus long terme, l'impact d'une exposition chronique de la mère gestante aux nanoparticules, sur l'embryon, l'animal nouveau-né et le juvénile (ex. développement

Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA), UMR CNRS 5287, Université de Bordeaux

³⁰ Cellules capables de produire en outre de la dopamine, neurotransmetteur connu du système nerveux central.

³¹ Partie du cerveau des mammifères. Elle joue un rôle notamment sur la mémorisation.

et fonctionnement des neurones des centres respiratoires).

La technique utilisée consiste à isoler la portion du système nerveux central commandant la respiration et à observer les signaux électriques qui en sont issus, signaux qui commandent notamment la contraction des muscles respiratoires. Les effets d'une exposition aigue aux nanoparticules (en particulier de métal) sur le fonctionnement des réseaux neuronaux de la respiration (temps de survie des préparations, variations des rythmes respiratoires, changements d'amplitude des activités respiratoires) seront donc étudiés sur ce type de préparation.

Les partenaires :

Didier Morin, Laurent Juvin et Angelo Nicolosi
Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INICIA), UMR CNRS 5287, Université de Bordeaux

Muriel Thoby-Brisson
CNRS UMR 5287 INICIA, Université de Bordeaux

Christèle Jaillet
Centre de Recherche Paul Pascal, Pessac

Durée : 14 mois

Financement : 50 K€

Contacts : didier.morin@u-bordeaux1.fr



La dissémination des nanomatériaux dans les milieux aquatiques naturels

Étude des processus de transformation en milieux naturels complexes des nanoparticules minérales manufacturées par l'utilisation des isotopes stables métalliques

Yann SIVRY et Izyan SUPIANDI

Mots-clés : dissémination, dissolution, écosystèmes aquatiques, environnement, nanométrie, micropolluants, milieux naturels, qualité des eaux, sols, nanoparticules, isotopes stables

Les problématiques concernant la préservation des réserves d'eau potable, des milieux naturels et de la biodiversité ont amené les gouvernements à adopter des mesures drastiques en termes de politique environnementale comme la Directive Cadre sur l'Eau en 2000³². Les nanoparticules manufacturées pourraient être concernées. Des études récentes tendent à démontrer que les nanoparticules manufacturées présentent un risque écotoxicologique (dispersion et dégradation dans l'environnement) et un risque en termes de santé humaine. Compte tenu de leur incorporation dans un nombre croissant de produits courants, la dispersion des nanoparticules dans le milieu naturel est inévitable. Les nanoparticules constituent aujourd'hui une nouvelle classe de micropolluants, dont le cycle de vie dans l'environnement doit être défini avec précision afin d'évaluer leur impact potentiel.

Des estimations récentes des flux de nanoparticules manufacturées libérées dans l'environnement ont été réalisées par différentes équipes à la fin des années 2000. Leurs calculs prédisent des flux pour les nanoparticules d'argent de l'ordre de 1 et 0,02 microgramme/kg/an dans les sédiments et les sols, respectivement. Ces concentrations sont plusieurs ordres de grandeurs plus faibles que celles couramment employées dans les études expérimentales de toxicologie, plutôt de l'ordre du milligramme/kg. Cette différence de concentration peut affecter le comportement physicochimique des

nanoparticules, notamment leur capacité d'agrégation ou encore leur solubilisation partielle. Or, si de premières études montrent des résultats contradictoires, elles soulignent néanmoins le caractère important des conditions environnementales. De même, des phénomènes variés peuvent intervenir. Par exemple, les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) sont peu stables dans les milieux aquatiques naturels comme l'eau de mer. Celles-ci se dissolvent très vite, et même plus rapidement que les particules d'oxyde de zinc de taille micrométrique. Dès lors, comment prédire leur mobilité potentielle dans les différents milieux environnementaux (eaux, sols, sédiments) ainsi que leur interaction avec des cellules vivantes ?

Le projet de recherche : Nanospike

Il est donc très difficile de travailler avec des conditions représentatives de l'environnement, qu'il s'agisse d'étudier la dynamique de ces nanoparticules ou leur écotoxicité. Cela suppose de maîtriser la mesure de nanoparticules en très faible concentration (de l'ordre de 10 à 100 nanogrammes par kg) dans différents milieux naturels, sachant que ceux-ci sont complexes et « bruyants »³³. Travailler sur de très faibles concentrations en nanoparticules, représentatives de la réalité, nécessite ainsi de lever un verrou analytique. L'utilisation, pour la nanométrie, d'outils innovants tels que la spectrométrie de masse Haute-Résolution (HR-ICP-MS) combinée avec un marquage des nanoparticules

Équipe Géochimie des eaux, IPGP, Université Paris Diderot, UMR CNRS 7154, Paris

³² Directive européenne 2000/60/EC.

³³ C'est-à-dire en présence d'un bruit de fond : *i.e.* en présence de colloïdes naturels mêlant matière minérale et organique, ainsi qu'en présence d'éléments constitutifs des nanoparticules, naturellement présents dans l'environnement en concentrations variables.

avec des isotopes stables peut permettre de résoudre cette difficulté.

“ *Comment prédire de façon réaliste le comportement et la mobilité potentielle des nanoparticules dans les différents milieux environnementaux ?* ”

Le principe repose sur l'existence, pour chaque élément chimique de généralement au moins deux isotopes stables³⁴ ayant des propriétés chimiques identiques. Dans la nature, le rapport entre les quantités d'isotopes stables (ou abondances isotopiques) d'un élément donné est pratiquement constant. Il est désormais possible de séparer les isotopes d'un élément et d'inverser artificiellement ces abondances. L'idée sous-jacente au projet consiste à fabriquer des nanoparticules d'abondances isotopiques différentes des abondances naturelles. Pour cela, les nanoparticules sont synthétisées à partir d'une solution enrichie avec l'un de leurs isotopes, on parle alors de traçage isotopique. Ce traçage doit permettre de distinguer les nanoparticules utilisées dans le cadre de l'expérience du bruit de fond géochimique. Il est ainsi possible de mesurer, avec une grande précision, jusqu'à de très faibles concentrations (inférieures à 100 ng/L) d'un élément isotopiquement enrichi. Le couplage de cette technique à la spectrométrie de masse est ensuite utilisé pour répondre aux questions posées sur le devenir et le comportement des nanoparticules dans les milieux aquatiques.

Le projet vise à mettre en œuvre ces techniques innovantes pour étudier leur dissémination à de très faibles concentrations dans les milieux aquatiques, c'est-à-dire :

- Leur solubilité dans une eau de rivière naturelle (ex. eau de la Seine), puis dans une eau de mer synthétique³⁵ ;
- Leur transformation, agrégation et absorption au contact de phases naturelles organiques (substances humiques) puis minérales (oxydes de fer, argiles) rencontrées dans les milieux naturels et susceptibles d'impacter le cycle de vie des nanomatériaux.

Deux types de nanoparticules minérales seront étudiés :

- Des nanoparticules d'argent, de 5 à 100 nm, qui constituent actuellement le plus grand nombre de nanoparticules manufacturées du fait de leurs propriétés bactéricides ;
- Des nanostructures de semi-conducteurs (ou « quantum dots ») de type cœur/coquille qui promettent des applications à grande échelle, dans les domaines du photovoltaïque, des diodes électroluminescentes et des essais biologiques.

Les partenaires :

Yann Sivry

Équipe Géochimie des eaux, IPGP, Université Paris Diderot, UMR CNRS 7154, Paris

Nicolas Menguy

Institut de minéralogie et de physique des milieux condensés, UMR 7590 CNRS, UPMC/IRD, Paris

Gaëlle Charron

UFR de Physique, Laboratoire MSC, Université Paris Diderot, UMR CNRS 7057, Paris

Durée : 45 mois

Financement : 189 K€

Internet : www.nanospike.fr

Contacts : sivry@ipgp.fr

³⁴ Les isotopes ne diffèrent que par le nombre de neutrons, donc leur masse atomique. On parle d'isotope stable quand les noyaux ne font pas l'objet de désintégrations radioactives. Un autre projet des cahiers de la recherche fait appel à l'un des isotopes instable du carbone, le carbone 14. Dans ce cas, on utilise la radioactivité pour suivre un nanotube.

³⁵ L'océan étant le réceptacle ultime de l'apport fluvial, il semble important aussi de mélanger ces deux types d'eau (simulation du milieu estuarien).

Le transfert trophique de nanomatériaux

Étude du transfert trophique de nanomatériaux et des conséquences sur les invertébrés aquatiques d'eau douce

Jeanne GARRIC

Mots-clés : nanoparticules manufacturées, altération, biofilm, cinétique, bioaccumulation, écosystèmes, écotoxicologie, métabolisme, oxyde de cérium, oxyde de titane, nanoparticule d'or, nano résidus

Les travaux concernant le devenir des nanoparticules dans l'environnement et leurs effets sur les écosystèmes sont encore très rares. Peu prennent en compte la manière dont les nanomatériaux manufacturés à base de nanoparticules se dégradent après usage et l'impact toxicologique de leurs résidus d'altération. Pourtant, compte tenu des tonnages produits et de la diversification des applications, il est pertinent de prendre ces questions en compte. Qu'en est-il, par exemple, du devenir de ces résidus en milieu aquatiques ? Comment impactent-ils les écosystèmes (ex. algues, poissons, prédateurs) ?



*Gammare mâle
(Source : J. Garric)*

Le projet de recherche : TRO-NANO

L'objectif du projet TRO-NANO est d'acquérir des données sur l'écotoxicité de trois types de nanoparticules manufacturées et de leurs résidus de dégradation. Il s'agit d'étudier les conséquences de l'exposition sur des biofilms d'eau douce et sur des macro-invertébrés benthiques contaminés par voie trophique.

Le choix a été fait de travailler sur des nanoparticules issues du commerce (produits de dégradation de NPs manufacturées à base de TiO_2 (Tlite®) et de CeO_2 (Nanobyk®)), du TiO_2 nu (rutile), ainsi que sur des nanoparticules d'or fonctionnalisées.

- **Les nanoparticules de TiO_2** absorbent les UV tout en interagissant peu avec la lumière visible. Cela permet de réaliser des crèmes solaires translucides. Ces nanoparticules sont enrobées d'une couche d'hydroxyde d'aluminium et/ou de silane pour annuler l'effet photocatalytique³⁶. Des résultats récents montrent comment ces matériaux peuvent se dégrader une fois dans l'eau.
- **Les nanoparticules de CeO_2** ont également des propriétés absorbantes pour le rayonnement ultraviolet et elles sont utilisées dans des peintures d'extérieur.

Laboratoire d'écotoxicologie UR MAEP, Lyon Irstea

³⁶ L'absorption du rayonnement UV induit des réactions chimiques à la surface qui rendent la particule très réactive. Cette propriété est utilisée pour réaliser des surfaces auto-nettoyantes. Lorsque la particule est dans une préparation en contact avec la peau on la recouvre d'hydroxyde d'aluminium et/ou de silane pour bloquer ce processus.

Ce type de produit étant amené à se développer en raison de l'augmentation des constructions en bois, se pose la question de leur résistance à long terme face aux intempéries et de leur lessivage vers l'environnement.

- **Les nanoparticules d'or (AuNp).** Ces nanoparticules du fait de leur forte densité électronique et capacité d'absorption aux rayons (X, γ) ont été utilisées dans la recherche, dans le domaine biomédical (comme agent de contraste), en radiothérapie, ou comme élément de vectorisation de molécules médicamenteuses. On les retrouve dans les produits de consommation courante, en cosmétique (crèmes anti-âge, produits de beauté), pour l'étiquetage des parfums ou encore dans les peintures dans le domaine des revêtements et des peintures de nouvelle génération.

Trois espèces d'organismes aquatiques ont été étudiées. Il s'agit de petits invertébrés, présents dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce, qui sont connus pour être de bons indicateurs de l'impact des contaminants environnementaux :

- **Le gammare (*Gammarus fossarum*)** est un crustacé surtout présent dans des substrats grossiers ; il est détritivore et se nourrit de débris d'origine naturelle (ex. débris végétaux).
- **Le gastéropode prosobranche *Potamopyrgus antipodarum*** est un mollusque présent dans les sédiments ; il se nourrit notamment du biofilm périphytique.
- **Le chironome (*Chironomus riparius*)**, insecte aquatique dont une partie du cycle de vie est aquatique (l'œuf, la larve, la puppe). Durant sa phase larvaire³⁷, l'espèce *C. riparius* se nourrit *via* les particules enrichies en matières organiques, présentes à la surface du sédiment.

Ces différents organismes sont exposés *via* la nourriture, (feuilles d'aulne pour les gammares, nourriture commerciale pour les chironomes et les gastéropodes), une fois celle-ci contaminée par les nanoparticules (TiO_2 , CeO_2). Des périodes d'exposition de une à quatre semaines ont été réalisées, selon l'organisme et les effets recherchés : 21 jours pour le crustacé, 28 jours pour le gastéropode et 7 jours pour le chironome.



Gastéropode Potamopyrgus adulte
(Source : J. Garric)

L'étude du transfert trophique des nanoparticules d'or a été réalisée à l'aide de biofilms riches en diatomées. Les effets de cette contamination ont été mesurés sur les biofilms ainsi que sur des gammares nourris durant 7 jours à l'aide de ces biofilms.

Résultats

Qu'il s'agisse de NPs de CeO_2 et TiO_2 ou de NPs Au, il est possible de contaminer en laboratoire des invertébrés par la voie trophique et cela de manière dose-dépendante. Les résultats confirment le transfert de nanomatériaux depuis la nourriture vers les organismes, mais sans mise en évidence d'un risque de bioamplification de la contamination. En fin d'exposition, selon les organismes étudiés, la réponse à la contamination a été évaluée à l'aide de plusieurs types d'approches : des mesures biologiques, des mesures biochimiques (indicateurs

³⁷ Qui se passe en majorité dans le sédiment.

de perturbations du métabolisme) et des mesures chimiques.

Avec le transfert de la contamination, depuis la nourriture vers les organismes étudiés, la contamination s'est accompagnée d'effets biologiques, mis en évidence par les réponses moléculaires.

- **Exposition au titane** : bien qu'il soit encore difficile de mesurer exactement le niveau d'imprégnation en titane des organismes, il semble que celui-ci ne s'accumule pas dans les invertébrés soumis à des doses faibles mais continues. La contamination par le TiO₂ n'entraîne pas d'effet drastique sur les traits de vie. Par contre, en fonction des espèces, on observe des réponses biochimiques, notamment sur les activités digestives, déjà rapportées lors d'exposition par voie aqueuses et pour des contaminations souvent élevées.
- **Exposition au cérium** : La contamination des gammars est bien corrélée à celle de la nourriture³⁸, mais aucune bioaccumulation n'est observée. Seules des modifications des activités digestives ont été détectées après sept jours d'exposition.
- **Exposition aux nanoparticules d'or** : le transfert trophique depuis le biofilm vers le gammare est avéré. La contamination par ces nanoparticules induit l'expression de certains gènes associés à la photosynthèse et au stress oxydatif, dans les biofilms contaminés ou chez les gammars. Les activités digestives des gammars sont impactées, et des modifications sévères sur la structure des mitochondries du tissu musculaire sont observées.

Retombées en termes d'évaluation du risque

Pour conclure, concernant le titane, et sur la base des modèles d'exposition actuels, nos résultats conduisent à un risque écotoxique très limité de résidus de Tlite® ou du TiO₂ rutil. Pour ce qui concerne les deux autres NPs, (Au et CeO₂) il est plus délicat de conclure, sans informations en termes de niveaux de contamination dans les milieux récepteurs.

Les conséquences à court et long terme d'une exposition aux nanomatériaux, dans un contexte environnemental réaliste, de stress multiples, sont encore largement inconnues et doivent être approfondies.

Enfin, la contamination par voie trophique est encore trop peu étudiée, et le développement de méthodologies adaptées aux organismes d'essai, et standardisées, serait nécessaire pour conduire des évaluations du risque écologique complètes et pertinentes.

Les partenaires :

Jeanne Garric

Laboratoire d'écotoxicologie UR MAEP, Lyon Irstea

Jérôme Rose

CEREGE, UMR 7330 CNRS / Aix-Marseille Université, Aix en Provence

Bruno Combourieu

Centre d'étude de substances naturelles (CESN), UMR CNRS 5557 UCBL, Lyon

Odile Dedourge-Geffard

Unité interactions animal-environnement (EA 4689), Université Reims Champagne Ardenne

Magalie Baudrimont

Écotoxicologie aquatique, UMR EPOC 5805, Université Bordeaux 1/CNRS

Durée : 36 mois

Financement : 157 K€

Contacts : jeanne.garric@irstea.fr

³⁸ Jusqu'à 20 µg Ce/g d'individu).



Internalisation et translocation des nanoparticules dans le poumon

Internalisation et translocation des nanoparticules d'oxyde de silice et d'oxyde de titane

Roger MARTHAN

Mots-clés : cellule, endothélium vasculaire pulmonaire, endocytose, épithélium respiratoire, passage, perméabilité, pollution atmosphérique, propriétés de surface, silice, titane, transcytose

Des études épidémiologiques ont montré que l'inhalation, l'accumulation et la rétention dans le poumon de particules inhalées ont un impact sur le déclenchement ou l'aggravation de maladies pulmonaires ou cardiovasculaires. Toutefois, il est difficile d'expliquer comment la présence de particules dans le poumon peut entraîner des effets néfastes sur des organes à distance, comme le cœur, qui n'est pas en contact direct avec l'air inhalé. Une hypothèse, parmi d'autres, est que des particules, une fois dans le poumon, pourraient passer dans la circulation sanguine pour atteindre des organes à distance de celui-ci. On parle alors de translocation. Si cette hypothèse se révèle correcte, l'effet pourrait être encore plus important pour les particules nanométriques en raison de leur taille encore plus réduite.

La translocation des nanoparticules

De nombreux travaux ont démontré que les nanoparticules peuvent s'accumuler à l'intérieur d'une cellule après avoir traversé sa membrane. Ce passage à travers les cellules semble être la voie principale pour le passage des nanoparticules au travers des barrières physiologiques. Ces barrières sont constituées de cellules jointives. Dans le cas du poumon on parle de cellules épithéliales respiratoires (pneumocytes) pour les cellules qui tapissent les alvéoles et de cellules d'endothéliales vasculaires pour les cellules qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins.

La traversée d'une barrière se déroule selon deux étapes :

- **L'internalisation**, c'est-à-dire la pénétration d'une nanoparticule présente dans un alvéole pulmonaire dans une cellule élément de la paroi d'un vaisseau sanguin.
- **La transcytose** désigne le transport à travers les cellules de l'épithélium vers les vaisseaux sanguins.

Comment l'internalisation et la transcytose de nanoparticules ayant des propriétés physico-chimiques et des tailles différentes s'effectuent-elles dans les cellules majoritairement présentes dans l'arbre respiratoire³⁹ ? Quels sont les phénomènes de modifications mis en jeu ? Autant de questions auxquelles essaie de répondre le projet TiSiTrans.

Le projet de recherche : TiSiTrans

Une première étape a été la synthèse⁴⁰ des nanoparticules de compositions chimiques (oxyde de silice et oxyde de titane), de charges de surface et de tailles variables (15, 50 et 100 nm) afin d'étudier comment les caractéristiques physico-chimiques pouvaient influencer la pénétration des nanoparticules dans les cellules. Un produit fluorescent a été greffé à ces particules pour pouvoir les localiser à l'aide de mesures optiques. D'autre part, le comportement de ces nanoparticules a été observé dans le milieu de culture. On observe une agrégation partielle induite par les protéines et les sels présents dans ce milieu.

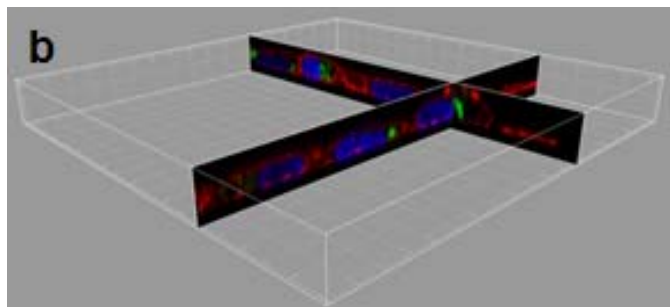
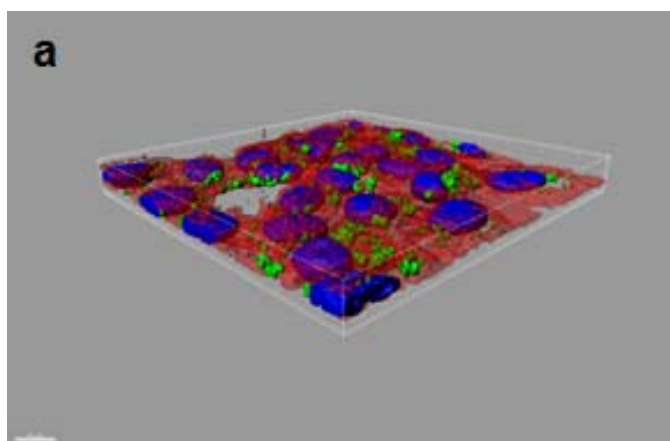
Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Inserm U 1045, Université de Bordeaux

³⁹ Épithélium respiratoire et endothélium vasculaire pulmonaire.

⁴⁰ Par voie sol-gel en milieu hydro-alcoolique en présence d'ammoniaque utilisé comme catalyseur d'hydrolyse et de condensation du précurseur de silice, le tétraéthoxysilane (TEOS).

Les nanoparticules qui avaient tendance à s'agréger complètement n'ont pas été utilisées.

Puis, des essais d'internalisation ont été menés sur des cultures de cellules représentatives de l'épithélium respiratoire et de l'endothélium vasculaire pulmonaire⁴¹. La pénétration des nanoparticules dans les cellules a été observée, grâce à des techniques optiques en éclairant un flot de cellules qui défilent devant un laser. Excité par le laser, le produit fluorescent marque les nanoparticules. L'appareil permet d'analyser l'internalisation des nanoparticules au niveau de chaque cellule qu'il détecte.



Reconstitution tridimensionnelle (a) et coupes orthogonales (b) d'une observation en microscopie confocale de cellules épithéliales NCI-H292 exposées pendant 24 h à des NPs de SiO₂-FITC de 50 nm à 5 µg/cm²

Résultats

Le projet a mis en évidence que les nanoparticules sont non seulement capables de pénétrer dans les cellules épithéliales mais aussi dans les cellules vasculaires pulmonaires. Le mécanisme impliqué est la pinocytose : une partie de la membrane de la

cellule entoure la nanoparticule, jusqu'à ce que celle-ci soit totalement englobée dans une sorte de bulle, une vésicule. Cette vésicule pénètre ensuite dans la cellule.

Plusieurs facteurs peuvent influencer ce phénomène. Par exemple, les nanoparticules qui présentent des charges positives à leur surface pénètrent plus facilement dans les cellules (par contre elles ressortent plus difficilement ensuite). La pénétration dépend ainsi des propriétés des nanoparticules mais également de leur environnement immédiat. Par exemple, la présence de surfactant pulmonaire⁴² dans la culture de cellule étudiée diminue l'internalisation des nanoparticules.

Une fois dans les cellules, les nanoparticules sont regroupées dans des vésicules. Le projet a permis de montrer que les nanoparticules, en plus de pouvoir pénétrer dans les cellules épithéliales respiratoires, sont capables de les traverser sans induire de cytotoxicité. Par contre, les nanoparticules de silice les plus fines peuvent endommager les cellules endothéliales.

L'équipe :

Roger Marthan, Arnaud Courtois, Isabelle Baudrimont

Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Inserm U 1045, Université de Bordeaux

Stéphane Mornet et Étienne Duguet

ICMCB-CNRS UPR 9048 (Institut de chimie de la matière condensée de Bordeaux)

Olivier Lambert

CBMN UMR 5248 (Chimie et biologie des membranes et nano-objets, Université de Bordeaux 1)

Armelle Baeza

RMCX EAC CNRS 7059 (Laboratoire des réponses moléculaires et cellulaires aux xénobiotiques)

Durée : 38 mois

Financement : 156 K€

Contacts : roger.marthan@u-bordeaux.fr

⁴¹ Deux modèles de cellules épithéliales respiratoires (cellules de la lignée NCI-H292 et cellules épithéliales humaines Calu 3) et un modèle de cellules endothéliales vasculaires.

⁴² Mélange de molécules secrétées par les cellules alvéolaires qui facilite la respiration.



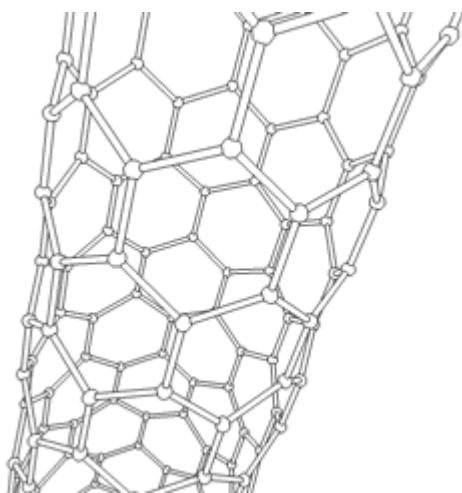
Passage de la barrière air/sang de nanotubes de carbone

Passage de la barrière air/sang de nanotubes de carbone après une exposition pulmonaire, impact de la toxicité sur les organes secondaires

Dr Frédéric TARAN

Mots-clés : barrière air/sang, biopersistance, exposition pulmonaire, nanotubes de carbone, radiomarquage

Popularisés dans le monde scientifique il y a une vingtaine d'années, les nanotubes de carbone présentent des propriétés inédites⁴³. Ils peuvent être utilisés sous la forme de fils en renfort dans certains matériaux ou comme nouveau matériau pour l'électronique. Leur morphologie fait penser à des tubes creux ou des fibres qui ressembleraient à de l'amiante : d'où des interrogations sur leur toxicité éventuelle.



Nanotube de carbone
(Source : Schwarz)

Au moment de la préparation de ce projet, des travaux sur la toxicité des nanotubes de carbone sur des souris avaient démontré que les nanotubes inhalés pouvaient traverser l'épithélium pulmonaire (la barrière air-sang).

Mais, on ignorait quelles pourraient être les conséquences de cette capacité à migrer dans le corps humain. Une des caractéristiques préoccupante des nanotubes, est leur biopersistance élevée : entre six et neuf mois après l'exposition des animaux – la quantité présente dans l'organisme restant stable. Il est également probable que leur taille (longueur, diamètre) influence le phénomène de translocation. Se posaient alors des questions telles que : les nanotubes de carbone peuvent-ils se déplacer à partir des poumons vers d'autres organes ? Comment observer leur comportement ?

Le projet Bio 14CNT

Les porteurs de projets avaient mis au point une méthode de marquage radioactif des nanotubes de carbone. Elle est fondée sur l'introduction dans les nanotubes de l'isotope radioactif du carbone, le carbone ¹⁴C, à la place d'une partie du carbone ¹²C qui constitue habituellement les nanotubes. Les nanotubes ainsi marqués deviennent radioactifs ce qui permet de les localiser à l'aide de radio imageurs, instruments permettant de réaliser des cartes de radioactivité de fines coupes d'organes⁴⁵ congelées. Sans cette méthode, il serait quasiment impossible de suivre des nanotubes dans un corps entier⁴⁶. Ils avaient ainsi obtenu des résultats préliminaires, montrant que, chez la souris, des nanotubes inhalés

CEA Saclay, Gif-sur-Yvette

⁴³ Un nanotube est cent fois plus résistant que l'acier et six fois plus léger. Suivant leur configuration ils peuvent conduire l'électricité.

⁴⁴ Le carbone ¹⁴C se transforme en azote en émettant un électron qu'on peut détecter. Il a une demi-vie de 5700 ans. Il en existe très peu dans la matière (une faible quantité est générée par les rayons cosmiques). Il est surtout connu pour la méthode de datation au carbone ¹⁴C qui permet de voir en dosant le carbone ¹⁴C depuis combien de temps un matériau a été soustrait à l'influence des rayons cosmiques.

⁴⁵ Tranches de 20 microns d'épaisseurs réalisées par un microtome.

⁴⁶ Il y a un facteur 25 000 entre la longueur du nanotube et la taille de l'organisme, ce qui revient à chercher une aiguille dans une meule de foin de 800 mètres.

se déplaçaient vers d'autres organes secondaires, même si une partie d'entre eux restait piégée dans le poumon. On pouvait donc soupçonner que l'inhalation de nanotubes pouvait affecter d'autres organes y compris chez l'homme.

Le but de ce projet est d'approfondir ce travail en mesurant la manière dont les nanotubes se répartissent entre organes puis sont éliminés.

“ *Les nanotubes de carbone, peuvent-ils se déplacer à partir des poumons vers d'autres organes ?* ”

La première étape du projet a consisté à produire des lots de nanotubes de carbone radiomarqués. Suivant le lot, le diamètre est de 20 ou 40 nanomètres et la longueur est de 1 ou 4 microns. Un atome de carbone 12 sur 17 a été remplacé par du carbone 14, ce qui correspond pour la poudre de nanotubes à une radioactivité importante. C'est nécessaire pour qu'un nanotube qui contient quelques millions d'atomes puisse être suffisamment radioactif pour être détecté. Ce type de travail ne peut être effectué que dans des installations spécialement conçues. Le diamètre et la longueur des nanotubes sont ensuite vérifiés par microscopie électronique et leur composition par ATG⁴⁷ et XPS⁴⁸. Puis, les tubes sont dispersés dans un liquide destiné à être inhalé. Il a été vérifié que les nanotubes étaient bien dispersés dans la solution.

L'étape suivante du projet en cours consiste à déposer ces nanotubes dans le poumon de souris. Le dépôt sera réalisé par « aspiration », un procédé qui permet un dépôt ciblé et contrôlé. Ensuite on observera sur deux ans comment les nanotubes migrent dans différents organes⁴⁹, et ceci pour trois lots de caractéristiques (diamètre, longueur) différents.

L'équipe :

Dr Frédéric Taran, Vincent Dive et Martine Mayne-L'Hermite
CEA Saclay, Gif-sur-Yvette

Durée : 36 mois

Financement : 200 K€

Contacts : Frederic.TARAN@cea.fr

⁴⁷ Analyse thermogravimétrique. Dans le cas présent, elle sert à doser le fer dans les nanotubes. L'échantillon est chauffé en présence d'oxygène. Le fer présent dans le nanotube s'oxyde ce qui se traduit par une prise de poids mesurable de l'échantillon.

⁴⁸ XPS signifie « spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X ». Il s'agit de mesurer les électrons arrachés au matériau lorsqu'il est illuminé par des rayons X. Cette mesure permet de mesurer la composition chimique du matériau. Dans le cas présent, il s'agit de vérifier le pourcentage de carbone des nanotubes.

⁴⁹ Cerveau, cœur, estomac, foie, ovaires, os, pancréas, poumon, rate, rein, utérus, thymus.



L'exposition des travailleurs au dioxyde de titane nanoparticulaire

Évaluation de l'exposition au dioxyde de titane nanoparticulaire et métrologie toxicologique

Jean-Paul MORIN

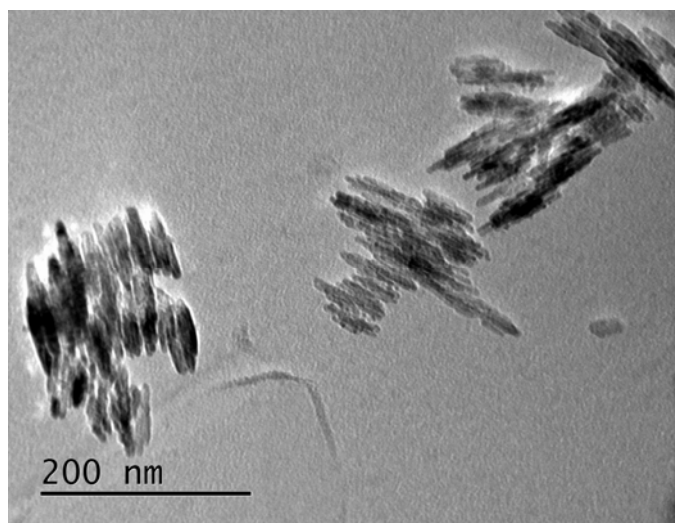
Mots-clés : aérosols de combustion, dioxyde de titane, dispersion, inhalation, métrologie, modèle, milieu industriel, oxyde de cérium, stress oxydant, toxicologie pulmonaire

Le dioxyde de titane est composé de titane et d'oxygène. Selon l'arrangement des atomes, il peut prendre plusieurs formes cristallines dont la forme rutile qui est la forme naturelle et l'anatase. Le dioxyde de titane présente des propriétés intéressantes. Tout d'abord il blanchit les préparations auxquelles il est incorporé (peinture, papier plastique, colorants alimentaires). D'autre part, il absorbe les rayons ultraviolets, d'où son utilisation dans des crèmes solaires. Enfin, il est photocatalytique (sous la forme anatase surtout) c'est-à-dire que lorsqu'il absorbe de la lumière il peut induire des réactions chimiques, ce qui permet de réaliser des matériaux autonettoyants.

Selon le registre R-nano, en 2013, 14.000 tonnes de ce TiO_2 sous forme nanoparticulaire ont été produites ou importées⁵⁰. Cependant, des préoccupations existent quant à la manipulation du dioxyde de titane (TiO_2) sous cette forme par les travailleurs ou quant aux procédures de sécurité sanitaire utilisées dans telle ou telle entreprise, en l'absence de protocoles standardisés. Dès lors, comment développer des modèles qui puissent être utilisés à des fins expérimentales ? Comment développer des outils de mesure adaptés pour comprendre la toxicité potentielle de ces matériaux ?

Le dioxyde de titane a longtemps été considéré comme étant peu toxique. Toutefois on a observé que l'inhalation de particules provoquait des réactions inflammatoires, et affectait les tissus qui tapissent les poumons.

Ces effets étaient plus marqués pour les particules de petite taille. Le Circ a classé le dioxyde de titane en catégorie 2B, c'est-à-dire cancérogène possible pour l'homme, du fait de preuves suffisantes dans des essais in vivo mais pas de données convaincantes chez l'homme.



(Source : Laurence Chevalier, GPM UMR CNRS6634)

En ce qui concerne les études de toxicologie pulmonaire, il importe de développer de nouveaux modèles qui simulent le poumon humain pour mesurer les effets des nanomatériaux par inhalation. Cela a suscité, dans un premier temps, la mise en place de dispositifs souvent complexes à manipuler (du fait de leur architecture) et limités en termes de productivité expérimentale. D'où cette question : comment renforcer, de manière significative, les expérimentations pour évaluer la toxicité des nanomatériaux tout en restant dans des conditions de gestion acceptables au laboratoire ?

Inserm U644, puis EA4651 ABTE Rouen

⁵⁰ http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_public_format_final_20131125-2.pdf

Le projet de recherche : ETiNMTox

Le projet travaille sur deux types de nanoparticules disponibles dans le commerce en grandes quantités.

- Du rutile utilisé pour les écrans UV de marque UV-EUSOLEX T2000 ;
- De l'anatase (pigment « Hombitan »).

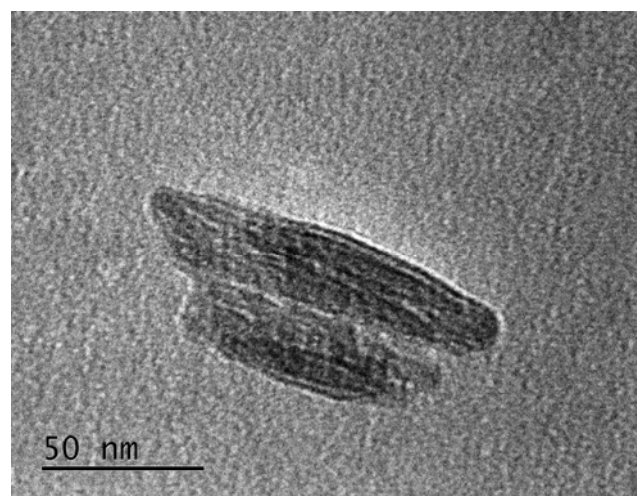
Des manipulations « industrielles » ont été réalisées pour estimer les aérosols produits. Par exemple, le déversement d'un sac d'EUSOLEX T2000 met en suspension des particules de TiO_2 à des concentrations de l'ordre de 10 mg/m^3 .

“ *Comment développer des outils de mesure adaptés pour comprendre la toxicité potentielle des nanomatériaux ?* ”

Cette suspension contient un mélange de nanoparticules de 50 nm (nombreuses mais représentant une masse faible) et d'autres plus grosses de quelques centaines de nanomètres. L'agitation de cette poudre peut produire des concentrations dix fois plus élevées. Il s'agissait ensuite pour les équipes de fabriquer un dispositif permettant de générer un tel aérosol de façon contrôlée pour simuler des atmosphères contaminées. Cela a été réalisé pour la poudre d'EUROLEX T2000 à l'aide d'une chambre remplie de TiO_2 dans laquelle on fait plonger un tube qui souffle de l'air. Ce dispositif associé à un séparateur cyclonique a été réglé pour générer deux types d'aérosols inhalables ($<10\mu\text{m}$), le premier à 20mg/m^3 le second à 200 mg/m^3 , les deux étant similaires en termes de distribution de taille des nanoparticules. L'autre produit, le pigment Hombitan, bien que constitué également de nanoparticules, n'a pu être aérosolisé, les particules tendant à s'agglomérer en agrégats de taille $>10\mu\text{m}$. Ce point mérite d'être signalé car il illustre la grande variété de comportements possibles pour l'aérosolisation de nanoparticules.

Depuis une dizaine d'années, les deux partenaires du projet ont développé, dans le domaine des nanoaérosols, deux modèles biologiques qui sont stables dans le temps et duplicables, d'une expérimentation à l'autre :

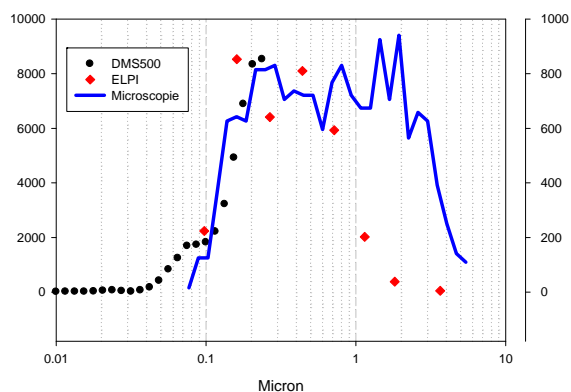
- Des cultures organotypiques de tissu pulmonaire (des tranches de poumon de rat) sur des inserts cylindriques en rotation, ce qui permet une exposition continue des cultures à un flux continu d'aérosol dans des chambres en rotation traversées par le flux d'aérosol ;
- Des cultures de monocouches cellulaires A549 à la surface de membranes poreuses, placées dans des chambres d'exposition circulaires, conçues de manière à générer un flux continu d'aérosol sur les puits de cultures, dans des conditions représentatives de ce qui se produit *in vivo* dans le poumon profond en matière de dépôts particulaires.



(Source : Laurence Chevalier, GPM UMR CNRS6634)

L'aérosol d'EUROLEX T2000 a été ensuite circulé au-dessus de ces deux modèles biologiques. Diverses mesures ont été réalisées dont une étude morphométrique en microscopie électronique, pour vérifier que les cellules étaient bien exposées à des nanoparticules (et des agrégats) et pour vérifier l'intensité de cette exposition. Ainsi, on estime que la circulation de l'aérosol 200 mg/m^3 dépose $2,6$ microgrammes de particules par centimètre carré et

par heure⁵¹, soit 1 à 2 particules sur chaque cellule en moyenne et par heure. Les photos ci-dessus montrent l'aspect des particules de TiO₂ Eusolex, l'histogramme ci-dessous montre la comparaison entre la distribution de taille des particules dans l'aérosol à l'entrée des chambres à celle des particules effectivement déposées à la surface cellulaire.



Divers tests ont été réalisés : viabilité des cellules, impact sur les mécanismes de défense de la cellule, sécrétion de molécules indicatrice d'une réaction inflammatoire, cassures de l'ADN. De manière générale, malgré cette très forte exposition surfacique, on observe des effets faibles qui dépendent du type de nanoparticule. Les cultures de tissus de poumon de rat sont plus sensibles que les cultures de cellules humaines. Les faibles effets observés démontrent une faible toxicité des nanoaérosols de TiO₂ dans les conditions expérimentales utilisées.

L'équipe :

Jean-Paul Morin et Christelle Monteil

Inserm U644, puis EA4651 ABTE Rouen

David Preterre et Frédéric Dionnet

Certam, Saint-Etienne du Rouvray

Durée : 24 mois

Financement : 198 K€

Contact : jean-paul.morin@univ-rouen.fr

⁵¹ Sur les 100 mètres carrés de surface d'échange des poumons humains, cela correspondrait à un dépôt de 2,6 grammes de matière par heure.



Le devenir des nanoparticules dans l'intestin

Devenir et toxicité de nanoparticules de dioxyde de titane après exposition orale chez le rat, impact de la taille des particules sur le franchissement de la barrière digestive et le risque de cancer colorectal

Éric HOUDEAU

Mots-clés : absorption, additif alimentaire, agrégation, cancérogenèse, colorant E171, dioxyde de titane, ingestion, intestin, nanoparticules, translocation, toxicologie

Dans les secteurs de l'alimentation et de l'emballage, les nanoparticules sont bien présentes et leur usage devrait croître, notamment du fait du développement de nouvelles applications. Elles peuvent en effet être utilisées comme agents antimicrobiens, colorants alimentaires ou agents texturants. Pourtant, les études de toxicité des nanoparticules par voie orale sont limitées, bien plus que celles portant sur la toxicité par inhalation. L'une des raisons en est la difficulté de les suivre dans les aliments en cours de digestion et dans l'organisme. Se posent les questions de l'impact local de ces nanoparticules sur la fonction intestinale, de leur distribution dans l'organisme et d'éventuels effets. Il importe donc de développer de nouvelles méthodes/approches pour mieux appréhender leur suivi et leur devenir dans l'organisme.

L'une des particules souvent évoquée en matière d'alimentation, est le dioxyde de titane. C'est une molécule composée d'oxygène et de titane, caractérisée par la formule chimique TiO_2 . Selon le registre national qui liste les nanoparticules fabriquées ou importées au niveau français, c'est la quatrième espèce par ordre d'importance avec 14.000 tonnes (issues des données déclarées) par exemple en 2013. Dans le secteur agro-alimentaire, c'est un pigment alimentaire blanc (colorant E171) qu'on trouve dans diverses confiseries, sauces, pâtisseries, etc. Ses propriétés bactéricides lui promettent également un usage répandu pour la conception de films plastiques alimentaires au contact de l'alimentation. Les travaux d'Alan Weir ont ainsi permis de montrer qu'un adulte pouvait en

absorber via son alimentation environ un milligramme par kg de poids corporel et par jour⁵².

Toutefois, le devenir des nanoparticules ingérées de TiO_2 le long de l'appareil gastro-intestinal et au contact des fluides digestifs est peu connu. On suppose que les agglomérats et agrégats contenus dans l'alimentation pourraient se désagréger dans les matrices gastriques à pH faible (forte acidité), libérant des particules de taille nanométrique, voire se dissoudre.



Coupe côlon de rat

(Source : Christel Cartier, Inra Toxalim)

Le dioxyde de titane est chimiquement inerte mais, il a été observé dans le cadre d'une exposition aérienne, que des concentrations élevées de TiO_2 pouvaient s'accompagner d'un cancer des voies respiratoires chez des rongeurs exposés. C'est pourquoi le TiO_2 a été récemment classé par le centre international de recherche sur le cancer (Circ)

⁵² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260395>

comme « *cancérogène possible pour l'homme* » (catégorie 2B). Avant le démarrage du projet NanoGut, quelques travaux ont été menés sur le dioxyde de titane ingéré. Ils donnent des indications sur le fait que les nanoparticules peuvent franchir la barrière de l'intestin et atteindre d'autres organes. Ce défaut de barrière pourrait non seulement favoriser la pénétration des nanoparticules vers l'organisme, mais aussi l'inflammation propice au développement de la carcinogenèse si l'effet s'avérait chronique. En complément de ces travaux, des modèles *in vitro* ont mis en évidence la migration de nanoparticules à travers une barrière de cellules qui simule la paroi de l'intestin, et des effets toxiques modérés. Ils ont toutefois été menés à fortes doses et demandaient à être poursuivis dans des conditions plus réalistes.

“ *Le devenir des nanoparticules ingérées TiO₂ le long de l'appareil gastro-intestinal et au contact des fluides digestifs est peu connu.* ”

Le projet de recherche : NanoGut

L'objectif du projet NanoGut est donc de fournir des données toxicologiques, utilisables dans les processus d'évaluation du risque lié à l'ingestion de nanoparticules de dioxyde de titane. Deux types de nanoparticules seront testés. Le premier est un additif alimentaire (E 171) disponible dans le commerce. Le second est un nanomatériau de référence, bien caractérisé, utilisé dans des tests de toxicité internationaux (le P25 Aéroxyde). Trois statuts d'agrégation seront étudiés, de gros agglomérats (tels qu'ils apparaissent sans agitation

particulière), une forme partiellement dispersée (agrégats submicroniques de 400-600nm) et une forme « nano » (<100nm).

Le premier objectif du projet est d'étudier le devenir des nanoparticules le long de l'intestin (distribution, agglomération, dissolution) et leur translocation au travers du tissu intestinal. Pour cela, deux méthodes très puissantes sont mises en œuvre pour l'observation des tissus : la micro fluorescence X à partir du rayonnement du synchrotron Soleil⁵⁵ et la détection isotopique en nanoSIMS⁵⁶. Elles permettent de suivre le devenir du TiO₂ dans l'intestin et les tissus avec une résolution inférieure à 100 nm et sur de larges champs optiques. En particulier, elles conduisent à observer leur accumulation potentielle au contact (dans la couche de mucus) et dans l'épithélium intestinal (passage hors et dans les plaques de Peyer, un des principaux constituants du tissu immunitaire associé au système digestif), puis les compartiments sous-muqueux et jusqu'au foie.

Dans un deuxième temps, la localisation du TiO₂ à l'intérieur des cellules sera précisée par microscopie électronique, notamment pour apprécier la distribution des particules libres nanométriques ou agrégées dans les cellules de l'épithélium et les cellules immunitaires présentes dans l'intestin.

Un second objectif du projet sera d'identifier l'impact d'une exposition orale subchronique⁵⁷ à des particules de TiO₂ sur la structure et la fonction de la barrière intestinale jusqu'à sa composante immunitaire. Cette barrière joue un rôle crucial quant à la protection d'un individu vis-à-vis de son environnement. Différents fragments de membranes prélevés le long de l'intestin seront testés dans des chambres de Ussing⁵⁸. Ces tests seront complétés par des mesures biologiques plus sophistiquées

⁵⁵ Le synchrotron Soleil est un anneau de 150 m de diamètre dans lequel tournent des électrons, à une vitesse proche de celle de la lumière. Ils émettent un rayonnement intense, 10.000 fois plus que celui du soleil. Une partie de ce rayonnement est sous forme de rayons X. Ceux-ci excitent les atomes de titane qui réémettent des rayons X à des longueurs d'onde caractéristiques de cet élément. Faire une image de cette lumière permet de réaliser une carte de la distribution du titane dans les tissus de l'intestin.

⁵⁶ Le nanoSIMS (pour Secondary Ion Mass Spectrometry) est une technique de microscopie couplée à un spectromètre de masse, très sensible et à haute résolution (inférieur à 100 nm), permettant de déterminer la composition élémentaire à la surface d'un échantillon.

⁵⁷ Exposition de durée déterminée allant de quelques jours à quelques semaines.

⁵⁸ Il s'agit d'un dispositif expérimental permettant de mesurer la "perméabilité" de l'intestin de part et d'autre de sa paroi, ainsi de tester l'efficacité de cette barrière naturelle de l'organisme.

destinées à mesurer l'intégrité des membranes, mais aussi le mode de transport des nanoparticules au travers des cellules (endocytose).

En parallèle, les cellules immunitaires présentes à la surface et dans l'intestin, dont le rôle est de défendre l'organisme contre les agressions extérieures tout en tolérant les produits sains de notre alimentation, seront étudiées.

Un troisième objectif portera sur les conséquences toxicologiques d'une exposition chronique (cent jours) à des particules minérales. En effet, le classement du Circ en 2B pour les cancers pulmonaires, et la démonstration d'une forte génotoxicité⁵³ sur des lignées épithéliales intestinales incitent à se poser la question du risque par rapport à la carcinogenèse colorectale lors d'une exposition orale. Pour cela des modèles animaux rendus plus sensibles au cancer du côlon⁵⁴ seront exposés sur des durées longues à du dioxyde de titane par voie alimentaire.

L'équipe :

Eric Houdeau

Inra, UMR 1331, Toxalim, équipe "Développement Intestinal, Xénobiotiques & ImmunoToxicologie", Toulouse

Fabrice Pierre

Inra, UMR 1331, Toxalim, équipe "Prévention et promotion de la cancérogenèse par l'alimentation", Toulouse

Elisa Boutet

Inra, UMR 1331, Toxalim, équipe "Génotoxicité & Signalisation", Toulouse

Marie Carrière

CEA, DSM/INAC/SCIB/LAN, Grenoble

Matthieu Réfrégiers

Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette

Durée : 39 mois

Financement : 195 K€

Contact : eric.houdeau@toulouse.inra.fr

⁵³ Mécanisme qui crée des dommages à l'ADN, susceptible de participer aux mécanismes de cancérogenèse.

⁵⁴ Par exposition à une substance chimique qui ne déclenche pas un cancer mais rend son apparition plus probable.



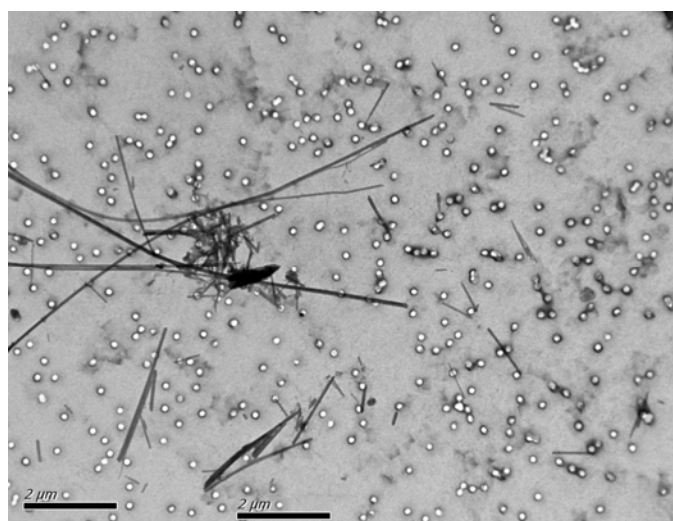
Immunotoxicité de nanoparticules métalliques

Immunotoxicité de nanoparticules métalliques

Thierry RABILLOUD

Mots-clés : argent métallique, cellule dendritique, macrophage, oxyde de titane, oxyde de zinc, silice, système immunitaire, toxicité

Le développement des nanotechnologies fait naître autant d'espoirs que d'inquiétudes. Parmi celles-ci figure la toxicité des nanoparticules qui est encore mal connue. Cette méconnaissance est entretenue par le fait que les travaux de recherche mènent souvent à des résultats contradictoires. Ces contradictions peuvent s'expliquer à la fois par les propriétés différentes des nanoparticules testées (même si elles sont de la même famille), mais aussi par des méthodologies variables d'un auteur à l'autre. D'autre part, la majorité de ces études sont fondées sur de simples tests de viabilité pour déterminer les effets toxiques (ex. méthode rapide de numération des cellules survivantes après une exposition). Or, si ces tests de toxicité sont pertinents pour évaluer les effets immédiats, ils ne permettent pas d'apporter d'arguments quant à l'importance d'effets à long terme. Or, le cas de l'amiante a montré combien ces effets à long terme pouvaient être importants et sévères.



Fibres d'amiante

Parmi les effets à long terme, il y a ceux sur le système immunitaire dont la fonction principale est de protéger l'organisme contre les agents étrangers (ex. bactéries, virus). On soupçonne que les nanoparticules puissent l'affecter et induire des dysfonctionnements tels que des inflammations chroniques ou des allergies.

- Un tel dysfonctionnement a été observé dans le cas d'une contamination avec des fibres d'amiante. On observe une inflammation chronique induite au niveau des poumons par les fibres, qui résulte de l'activation soutenue et continue des macrophages pulmonaires. Ces cellules, dont le rôle est de phagocyter les intrus qui ont réussi à se faufiler jusqu'aux alvéoles pulmonaires, ne parviennent pas à absorber les fibres.
- De même, de récents travaux ont mis en évidence que les particules de silice amorphe étaient capables de modifier les cellules dendritiques humaines *in vitro*. Ces modifications aboutissent à une augmentation du relargage de molécules activant le système immunitaire ce qui montre qu'il existe un potentiel « adjuvant » pour ces nanoparticules, avec pour conséquence une possible augmentation des allergies à d'autres produits comme des pollens ou des molécules chimiques.

Le projet de recherche : Innimmunotox

Le projet porte sur l'étude de la fonctionnalité de cellules du système immunitaire (des cellules dendritiques et des macrophages), mises en présence

de nanoparticules. Ces cellules sont obtenues à partir de la moelle osseuse de souris.

On a choisi pour cette étude, deux types de nanoparticules : les nanoparticules d'oxyde de zinc d'une part et d'argent métallique d'autre part.

- Les nanoparticules d'oxyde de zinc sont utilisées, comme l'oxyde de titane, dans les crèmes solaires ; elles reçoivent de nombreuses applications, comme désinfectant (ex. cosmétiques, textiles), dans les peintures (en particulier anticorrosion) ou encore dans la vulcanisation du caoutchouc. Enfin, les nanoparticules rencontrées dans les fumées d'oxyde de zinc (ZnO) sont souvent en cause dans une maladie professionnelle : la fièvre des métaux. Selon la base de données de la production/ importation⁵⁹ de nanoparticules, l'oxyde de zinc est, avec près de 290 000 tonnes, la neuvième par ordre de tonnage.
- Les nanoparticules d'argent métallique (Ag), quant à elles, sont utilisées pour leurs propriétés biocides comme anti odorants, par exemple, dans des produits textiles, pour la purification de l'eau, des cathéters et autres dispositifs médicaux, etc. Ceci entraîne une forte libération dans les eaux de lavage et un potentiel d'exposition pour le grand public, ce qui a conduit l'Anses à publier des recommandations pour l'usage de ces nanoparticules.

“ *Comment les cellules du système immunitaire réagissent-elles, mises en présence de nanoparticules ?* ”

Les nanoparticules (taille 100 nm) choisies sont issues du commerce, afin que l'étude corresponde à des situations d'exposition réelle. Elles sont recouvertes d'une couche de polymère. Des témoins ont également été utilisés : des particules d'oxyde de

zinc non recouvertes et des solutions de sels de zinc ou d'argent pour comparer l'effet de l'espèce chimique lorsque celle-ci n'est pas sous forme particulaire. Les nanoparticules sont observées dans le milieu de l'expérience, pour vérifier qu'elles restent bien sous forme nanométrique. On observe que les nanoparticules d'argent restent isolées, celles de zinc formant de petits agrégats de 250 nanomètres.

Les cultures cellulaires (macrophage) sont mises en contact avec des nanoparticules à des concentrations de l'ordre de quelques microgrammes par millilitre et leur effet est observé. Des premiers résultats ont été obtenus.

Premiers résultats

Pour obtenir des valeurs de référence, les concentrations entraînant la mort d'une partie significative des cellules ont été recherchées. Par exemple, en 24h, l'oxyde de zinc est létal pour une forte proportion des macrophages (près de la moitié) à une dose de 10 microgrammes par millilitre. Sur ces mêmes cellules, les nanoparticules d'argent sont toxiques à des concentrations du même ordre. On observe également que l'argent, lorsqu'il n'est pas sous la forme de nanoparticules, est beaucoup plus toxique, alors que les toxicités du zinc ionique et nanoparticulaire sont très proches. Ces résultats sont modérément concordants avec ceux d'autres études qu'on trouve dans la littérature, ce qui atteste des difficultés mentionnées plus haut.

Dans le cas de contamination avec des nanoparticules d'oxyde de zinc et d'argent, on a imagé directement les cellules par microscopie électronique. On observe que les cellules ont absorbé une partie des nanoparticules, souvent une par une et les « digèrent ».

Les macrophages défendent l'organisme en phagocytant les intrus. L'équipe a cherché à voir si les nanoparticules n'affectaient pas ce mécanisme. Cette mesure est effectuée en observant comment les macrophages exposés aux nanoparticules pouvaient continuer à ingérer des petites billes de latex fluorescentes. On observe ainsi que l'oxyde de zinc a

⁵⁹ http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/Rapport_public_format_final_20131125.pdf

un effet très faible. Les nanoparticules d'argent à une dose de 5 microgrammes par millilitre durant un jour inhibent cette capacité d'un facteur deux. Il y a donc un effet très visible. Toutefois, le macrophage récupère ses capacités en trois jours. De même, des expositions plus faibles sur des temps plus longs (1,25 µg/ml durant 4 jours) ont peu d'effet sur le fonctionnement du macrophage.

On a également étudié la réaction immunitaire en mettant les macrophages en les mettant en présence de Lipopolysaccharide⁶⁰ (LPS) qui simule la présence de bactéries. Les macrophages réagissent en exprimant différents gènes et aussi en émettant de l'oxyde d'azote. On observe un clair effet inhibiteur du nano-argent. Toutefois, là encore, le macrophage récupère en quelques jours et est moins sensible à des doses étalées dans le temps, plus proches des caractéristiques d'une exposition professionnelle.

Les partenaires :

Thierry Rabilloud

CEA, Grenoble

Marc Pallardy

Inserm UMR 996, Université Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry

Marie Carrière

CEA Grenoble DSM/INAC/SCIB/LAN, Grenoble

Durée : 36 mois

Financement : 180 K€

Contact : thierry.rabilloud@cea.fr

Le système immunitaire

Les réponses immunitaires peuvent être schématisées en deux catégories distinctes :

- La réponse innée, qui implique notamment des cellules qui phagocytent c'est-à-dire absorbent et digèrent des agents étrangers. Parmi elles, les macrophages. Une bonne partie des macrophages se situent à des points stratégiques, comme les macrophages alvéolaires qui « surveillent » les alvéoles pulmonaires.
- La réponse adaptative, qui est activée quand l'organisme « reconnaît » un intrus. Un acteur de la phase initiale de cette réponse est la cellule dendritique. Cette cellule capte des antigènes (des fragments du corps, étrangers susceptibles de déclencher le système immunitaire) puis migre et présente ces antigènes à d'autres cellules – ce qui déclenche une réaction spécifique à ce type d'antigène.

⁶⁰ Composant qu'on trouve à la surface de certaines bactéries.



Nanoparticules et cellules rénales

Étude de la réponse adaptative des cellules rénales aux nanoparticules inorganiques

Dr Béatrice L'AZOU

Mots-clés : accumulation, biomarqueurs, cadmium, cultures de cellules, mécanismes cellulaires, rein, silice, titane, stress oxydant, viabilité cellulaire

Plusieurs études toxicologiques concernant les effets des nanoparticules sur le poumon après inhalation ont montré que celles-ci pouvaient franchir la paroi des alvéoles pulmonaires et gagner la circulation sanguine. Ainsi véhiculées, les nanoparticules peuvent atteindre différents organes cibles et avoir des effets biologiques. Le rein constitue l'un de ces organes cibles, du fait de ses fonctions de filtration, de transport et de réabsorption. La question qui se pose est de savoir si la présence de nanoparticules au niveau du rein pourrait avoir des répercussions sur son fonctionnement.

Le projet de recherche : NanoAdapt

Le but de ce projet est d'étudier l'effet de différentes nanoparticules sur des cellules de rein en culture. Deux types de cellules rénales humaines ont été utilisés. Le premier type est représenté par une lignée de cellules « saines » (lignée HK-2) issues du segment de l'épithélium proximal tubulaire impliquées dans la réabsorption et l'accumulation des substances après filtration rénale. Le deuxième type est une lignée de cellules « tumorales » (lignée 786-O) issue d'un adénocarcinome du même segment. La comparaison entre ces deux types de cellules peut être intéressante, les cellules cancéreuses étant décrites comme plus sensibles que les cellules saines.

Les porteurs des projets ont proposé d'étudier trois nanoparticules inorganiques : le dioxyde de titane (TiO_2 , taille environ 10 nanomètres), la silice, également très utilisée (SiO_2 , taille environ 20 nanomètres) et le sulfure de cadmium qui offrent des

propriétés optiques et électroniques intéressantes (CdS, taille environ 8 nanomètres). Ces nanoparticules ont été dans un premier temps caractérisées dans les milieux de culture. En effet, leurs comportements et leurs interactions avec les systèmes biologiques dépendent de leurs propriétés physico-chimiques (taille, état d'agrégation, propriétés de surface, solubilité, ...). On constate en particulier que les nanoparticules de silice et de sulfure de cadmium sont partiellement solubles, et que celles de dioxyde de titane insolubles ont une tendance marquée à s'agglomérer.

Les deux types de cellules ont été mis en présence d'un milieu de culture ne contenant aucune nanoparticule (témoins) ou contenant des concentrations allant de 1 à 20 milligrammes par litre pour les nanoparticules de cadmium ou jusqu'à 500 milligrammes par litre pour les nanoparticules de silice et de titane. Nous avons proposé :

- De visualiser les nanoparticules dans les cellules par microscopie électronique et de quantifier la partie métallique de ces nanoparticules à l'intérieur des cellules par des méthodes analytiques de spectrométrie.
- D'évaluer l'impact des nanoparticules sur les cellules par mesure de la viabilité cellulaire ou de leur capacité à proliférer, en fonction de la dose. Une altération de la perméabilité membranaire peut aussi se traduire par des « fuites » et il sera intéressant de réaliser un dosage de protéines, normalement intracellulaires, relarguées dans le milieu de culture.

- De mettre en évidence, les mécanismes cellulaires induits par les nanoparticules et notamment la survenue d'un stress oxydant souvent à l'origine d'une toxicité. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), et le déclenchement des mécanismes de défense de la cellule pour neutraliser ces ERO permettent de mettre en évidence ce stress oxydant.

L'objectif principal de cette étude est de mieux comprendre les mécanismes cellulaires induits par les nanoparticules afin d'identifier une signature ou un indicateur témoignant de cette exposition (on parle de biomarqueur). L'induction de protéines de stress, la production de protéines de détoxication, comme les métallothionéines et la libération d'enzymes tubulaires pourraient servir de marqueurs d'effets des nanoparticules métalliques.

“

La présence de nanoparticules au niveau du rein peut-elle avoir des répercussions au niveau de son fonctionnement ?

”

Résultats

Les trois nanoparticules étudiées présentent des propriétés physico-chimiques différentes, en termes de composition chimique, réactivité de surface et solubilité. Les trois sont bien internalisées par les cellules et facilement identifiables dans des vésicules. Les réponses cellulaires peuvent aller d'une simple modification du métabolisme des cellules à leur mort. La toxicité des nanoparticules dépend (1) de leur composition chimique (les nanoparticules les plus toxiques sont celles de sulfure de cadmium); (2) de leur solubilité (le cadmium partiellement soluble, libère l'ion cadmium lui-même très toxique); (3) leur taille (en comparant deux tailles de nanoparticules de composition identique, les particules de silice de 20 nm se sont montrées plus toxiques que celles de 100 nm).

Nous avons montré que le dioxyde de titane, insoluble et aggloméré dans le milieu de culture, n'entraîne que peu d'effets (la forte agglomération des nanoparticules d'oxyde de titane atténue peut être leur caractère « nano »). Ces résultats mettent aussi en évidence une différence de sensibilité entre les cellules saines et les cellules cancéreuses, montrant l'importance de tenir compte de l'état physiologique cellulaire dans la survenue de la toxicité.

Le projet confirme que les effets induits par les nanoparticules résultent, en grande partie, d'un stress oxydant avec production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). En réponse à ce stress, la cellule produit des enzymes anti-oxydantes qui représentent des systèmes de défense très efficaces, puisque ces enzymes ont pour rôle d'éliminer des radicaux libres primaires. Dans notre étude, une induction de l'expression de certaines enzymes anti-oxydantes est notée pour les nanoparticules les moins cytotoxiques alors que ces systèmes sont dépassés pour les nanoparticules induisant un effet cytotoxique. Pour les nanoparticules de cadmium, d'autres protéines ligands de détoxication (les métallothionéines, MT) entrent en jeu. Ces protéines ligands ont une forte affinité pour les ions métalliques (ions cadmium) et des complexes MT-cadmium détectés sont les témoins indirects d'une exposition au cadmium.

Des études complémentaires en spectroscopie infrarouge ont été mises en œuvre. L'analyse des spectres a permis de révéler des changements dans la composition moléculaire des cellules après exposition aux nanoparticules par rapport aux cellules témoins. La sensibilité de la méthode nous a permis de mettre en évidence des modifications induites par les ERO avec notamment, une oxydation des lipides membranaires des cellules et des modifications dans la conformation de certaines protéines dans la cellule.

In vivo, les atteintes rénales peuvent être mises en évidence par des dosages d'enzymes anormalement relarguées dans la lumière tubulaire et dans l'urine. Par analogie, nous avons recherché des enzymes

« marqueurs » issus de cellules endommagées et relarguées dans les milieux de culture.

Parmi les enzymes urinaires répertoriées nous avons choisi, γ GT, IL8, NAG, et KIM-1. Les études préliminaires ne montrent aucun relargage de NAG et γ GT aux concentrations de nanoparticules étudiées. Seule une quantité augmentée de KIM-1 est obtenue dans certaines conditions. Ces résultats sont donc à confirmer.

L'équipe :

Béatrice L'Azou

Laboratoire de biologie cellulaire, FRE 3396
Pharmacochimie, Université Bordeaux Segalen

Dr Sandra Mounicou

Laboratoire de chimie analytique, Bio inorganique et
environnement, CNRS UMR 5254, Pau

Dr Mona Tréguer

Institut chimie matière condensée de Bordeaux,
Université de Bordeaux

Pr Céline Ohayon-Courtès

Laboratoire hydrologie environnement, Université
Bordeaux 2

Durée : 18 mois

Financement : 48.841 €

Contact : beatrice.lazou@u-bordeaux.fr

Accumulation intracellulaire

Les nanoparticules peuvent pénétrer dans les cellules et s'y accumuler. La littérature indique que, souvent, les nanoparticules sont internalisées par endocytose. C'est un mécanisme au cours duquel la membrane d'une cellule se déforme, enveloppe les particules puis forme une vésicule qui les transporte vers l'intérieur (du gr. *endon* dedans). Bien que de très petites tailles, les nanoparticules pénètrent rarement seules en diffusant à travers la membrane. Une fois à l'intérieur, les nanoparticules peuvent induire des dysfonctionnements cellulaires.

Il est donc indispensable, avant tout, de vérifier si les nanoparticules pénètrent bien dans les cellules. On peut par exemple, les rechercher en observant la cellule par microscopie électronique.

Nanoparticules et fonction de reproduction

Nanoparticules et fonction de reproduction, impact des nanoparticules de noir de carbone sur les fonctions endocrines ovariennes et gonadotropes hypophysaires

Joëlle COHEN-TANNOUDJI

Mots-clés : endocrinologie, expositions chroniques, nanoparticules, noir de carbone, fonction de reproduction, hydrocarbures, modélisation moléculaire, perturbateurs endocriniens, toxicologie

L'essor des nanotechnologies entraîne un accroissement de l'exposition des populations aux nanoparticules manufacturées issues de matériaux variés, qui s'ajoutent à celles produites non intentionnellement. Parmi les nanoparticules, celles de noir de carbone sont largement utilisées dans l'industrie. Elles sont le plus souvent produites par combustion contrôlée ou décomposition d'hydrocarbures. Les secteurs d'activité concernés sont les pneumatiques et autres caoutchoucs, les plastiques et les encres d'imprimerie. Or, les nanoparticules de noir de carbone sont considérées par le Centre international de recherche sur le cancer (Circ) comme des cancérogènes potentiels chez l'homme (groupe 2B). Même si leur impact sur la santé nécessite d'être mieux compris, elles ont été associées en particulier à des inflammations du tissu pulmonaire, à des bronchopathies ainsi qu'à un risque accru de cancer pulmonaire. Ces nanoparticules peuvent être transportées rapidement vers l'intérieur des cellules épithéliales bronchiques. Leur chemin peut ne pas s'arrêter là. On en observe également dans différents organes tels que le foie, la rate, le cœur et même le cerveau. On peut donc s'interroger sur de possibles effets liés à leur présence dans ces organes.

Les troubles de la fonction de reproduction

Au cours de ces dernières décennies, l'impact de l'environnement sur la fonction de reproduction a suscité beaucoup d'inquiétudes. Une attention particulière a été portée sur les perturbateurs endocriniens, des substances chimiques susceptibles

de brouiller les informations transmises par les hormones et notamment par les hormones stéroïdes sexuelles⁶¹. D'autre part, de nombreuses études ont mis en évidence des troubles de la fonction de la reproduction comme, par exemple : l'avancement de l'âge de la puberté chez les jeunes filles, la détérioration de certaines caractéristiques spermatiques ou l'augmentation de cancers hormono-dépendants (ex. cancers du sein, de la prostate...).

La question traitée dans ce projet est la recherche d'une possible action des nanoparticules de noir de carbone sur la fonction de reproduction. En effet, des travaux menés *in vivo* chez la souris mâle et *in vitro* sur des lignées cellulaires testiculaires ont suggéré que les nanoparticules de noir de carbone peuvent affecter la production de spermatozoïdes et de l'hormone testostérone par le testicule. Quant au système de reproduction femelle, aucune donnée n'est actuellement disponible.

Le projet de recherche : NANOVHYP

Ce projet, qui réunit des équipes compétentes dans les domaines de l'endocrinologie de la reproduction et de la toxicologie, vise à évaluer la toxicité des nanoparticules de noir de carbone sur la fonction endocrine de l'hypophyse et des ovaires. Cette démarche intégrée s'articule autour de trois axes de recherche :

1. Analyser l'impact des nanoparticules de noir de carbone, après exposition *in vitro* et *in vivo* chez la souris par voie pulmonaire⁶², sur les

⁶¹ Les Cahiers de la recherche, *Les perturbateurs endocriniens en 12 projets*, Anses, décembre 2012.

⁶² Instillation intra-trachéale.

fonctions endocrines de la reproduction, notamment des ovaires (ou gonades femelles) et de l'adénohypophyse, une glande située à la base du cerveau. Au sein de l'adénohypophyse, qui sécrète diverses hormones, les cellules gonadotropes produisent deux hormones liées à la reproduction : l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). Cette activité est elle-même gouvernée par la GnRH⁶³ une neurohormone sécrétée par l'hypothalamus.

“ *Y a-t-il une possible action des nanoparticules de noir de carbone sur la fonction de reproduction chez la femelle ?* ”

2. Identifier, dans les cellules, les cibles moléculaires des nanoparticules de noir de carbone afin de savoir avec quelles protéines clés, elles interagissent et de quelle manière (modification du niveau d'expression et/ou altération des caractéristiques physico-chimiques). Pour cela des cultures de cellules, lignées et cultures primaires, issues de l'adénohypophyse ou de l'ovaire, sont incubées dans un milieu contaminé avec des nanoparticules de noir de carbone du commerce, à des concentrations comprises entre 25 et 200 microgrammes par millilitre⁶⁴. On mesure en particulier la manière dont est modifiée l'expression des gènes des cellules. Pour les cellules de l'hypophyse antérieure, on analyse comment la synthèse de LH ou de FSH est modifiée. Pour celle de l'ovaire, on peut observer la synthèse et l'activité des enzymes qui interviennent dans la production d'œstradiol, hormone sexuelle, impliquée notamment dans le contrôle du cycle sexuel.

3. Modéliser les interactions entre nanoparticules de noir de carbone et protéines cibles pour prédire certains mécanismes d'action sous-jacents et obtenir des indications sur les déterminants physiques et chimiques impliqués dans la toxicité de ces nanoparticules, en utilisant des simulations de dynamique moléculaire à différents niveaux de résolution (échelle atomique ou à gros grains).

Le projet est en cours. Il a ainsi été mis en évidence pour la première fois, dans des cellules gonadotropes, une perturbation de l'expression des gènes des hormones LH et FSH et de leur régulation par la GnRH. La plupart de ces effets ont été observés en présence de nanoparticules à des concentrations de l'ordre de 50 microgrammes/millilitre. On observe également dans les cellules endocrines de l'ovaire, une diminution de l'activité de l'enzyme aromatasase, à l'origine de la synthèse d'œstradiol. Des travaux sont en cours pour confirmer ces résultats.

L'équipe :

Joëlle Cohen-Tannoudji

Équipe Physiologie de l'Axe Gonadotrope INSERM U1133, Unité de biologie fonctionnelle et adaptative CNRS UMR 8251, Université Paris Diderot, Paris

Jean-Marie Dupret

Équipe Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques, Unité de biologie fonctionnelle et adaptative CNRS UMR 8251, Université Paris Diderot, Paris

Jorge Boczkowski

Équipe Physiopathologie de la bronchopneumopathie chronique obstructive et autres conséquences respiratoires de l'inhalation de particules de l'environnement, Inserm U955, Faculté de Médecine de Créteil, Créteil

Catherine Etchebest

Équipe Dynamique des structures et interactions des macromolécules biologiques, INTS, INSERM UMR- S 665, Université Paris Diderot, Paris

Durée : 36 mois

Financement : 199.999 €

Contact : joelle.cohen-tannoudji@univ-paris-diderot.fr

⁶³ Acronyme anglais pour hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires.

⁶⁴ 1 microgramme par millilitre correspond à une concentration en masse de un millième.



Le registre R-nano

Dans le cadre des rencontres du Grenelle de l'environnement en 2007, les parties prenantes participantes ont exprimé un engagement relatif à l'anticipation des risques liés aux nanomatériaux⁶⁵. Pour répondre à cet engagement, la loi Grenelle I du 3 août 2009 prévoit notamment la déclaration obligatoire pour la fabrication, l'importation ou la mise sur le marché des nanomatériaux en vue d'une meilleure information du public, des consommateurs et des travailleurs. Ce qui a conduit à la création du registre R-nano, qui permet aux industriels depuis le 1er janvier 2013, de déclarer les nanomatériaux, conformément à la réglementation en vigueur.

On a longtemps travaillé sur des nanoparticules sans se soucier de l'existence d'une définition officielle ou non de ces objets. Il n'est pas rare qu'un chercheur travaille sur un objet avant qu'il en existe une définition. De toutes manières, il n'existe pas de définition scientifique d'un tel objet, c'est-à-dire une mesure précise permettant de statuer sur son caractère « nano ».

Lorsqu'on a voulu édicter des règles, comme l'obligation de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire, la question de leur définition s'est posée pour préciser quand la réglementation s'appliquait. Au niveau français, cela est précisé dans le décret daté du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire et qui définissait une « **substance à l'état nanoparticulaire** » comme étant « *fabriquée intentionnellement à l'échelle nanométrique, contenant des particules, non liées ou sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont une proportion minimale des particules, dans la distribution des tailles en nombre, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm* ».

Un arrêté du 6 août 2012 relatif au contenu et aux conditions de présentation de la déclaration, précisa ensuite la proportion minimale à 50% en nombre.

La loi Grenelle II, votée le 12 juillet 2010, fixe comme objectif⁶⁶ d'obtenir :

- une meilleure connaissance des nanomatériaux, à savoir leur identité, les quantités manipulées, et les différents usages et domaines d'application ;
- la traçabilité : depuis le fabricant ou l'importateur jusqu'au distributeur auprès du dernier utilisateur professionnel ;
- le rassemblement de connaissances sur les nanomatériaux en vue de l'évaluation des risques et de l'information du public.

Suite à cette loi, le code de l'environnement prévoit que les substances à l'état nanoparticulaire fassent l'objet d'une déclaration annuelle et que les entités concernées transmettent, sur demande, des informations complémentaires relatives aux dangers et aux expositions auxquelles ces substances sont susceptibles de conduire⁶⁷.

Conformément au calendrier prévu par les textes réglementaires, le site internet dédié à la déclaration a été ouvert aux déclarants le 1er janvier 2013 : www.r-nano.fr . Ce site permet :

- le recueil des déclarations issues des acteurs professionnels (fabricants, importateurs, distributeurs) et des centres de recherche concernés ;
- la mise à disposition du public d'informations relatives à l'identité et aux usages des substances à l'état

⁶⁵ Engagement No 159.

⁶⁶ Article 185.

⁶⁷ Articles L. 523-1 et L. 523-2.

nanoparticulaire déclarées.

Les données déclarées

Parmi les données déclarées, figurent le nom chimique de la substance, les listes d'usages ainsi que les quantités des substances à l'état nanoparticulaire produites, importées et distribuées en France. En 2014 :

- plus de 10.417 déclarations ont été soumises (contre 3.409 en 2013) ;
- par plus de 1.500 entités déclarantes (contre 732 en 2013) mettant en lumière un secteur d'utilisation particulier : « agriculture, sylviculture, pêche »⁶⁸.

La transmission du numéro de déclaration permet une meilleure transmission de l'information tout au long de la chaîne de distribution : des producteurs et/ou importateurs aux utilisateurs, via les distributeurs. Ainsi, de nombreux fournisseurs ont transmis leur numéro de déclaration à leurs clients et certains d'entre eux ont découvert qu'ils étaient concernés par l'usage et la manipulation de substances à l'état nanoparticulaire. C'est l'un des points positifs de ce dispositif de déclaration annuelle.

www.r-nano.fr

⁶⁸ Ces nouvelles déclarations ne correspondent pas nécessairement à de nouvelles applications pour les substances à l'état nanoparticulaire correspondantes. Elles peuvent s'expliquer par le caractère récent du dispositif et le fait que certains utilisateurs en aval de ce secteur avaient sous-déclaré en 2013.



Les plans nationaux

Les projets de recherche valorisés dans ces Cahiers de la recherche (Santé, Environnement, Travail) ont été financés dans le cadre des Plans nationaux mentionnés ci-dessous.

3^{ème} Plan national santé environnement 2015-2019

Le Plan national santé environnement (PNSE) vise à répondre aux interrogations des Français sur les conséquences sanitaires à court et moyen terme de l'exposition à certaines pollutions de leur environnement. Conformément à l'article L. 1311 du code de la santé publique, il est renouvelé tous les cinq ans.

Ce troisième plan témoigne de la volonté du gouvernement de réduire autant que possible et de façon la plus efficace les impacts des facteurs environnementaux sur la santé afin de permettre à chacun de vivre dans un environnement favorable à la santé. Parmi les dix actions immédiates portées par les Ministères en charge de l'écologie et de la santé : **assurer une vigilance sur les risques potentiels liés aux nanomatériaux.**

En effet, les nanosciences font l'objet d'efforts intenses de recherche et d'innovation. Pour autant, l'évaluation des risques potentiels est encore très incomplète. De très nombreux paramètres sont invoqués dans les mécanismes de toxicité des nanomatériaux. L'identification du ou des facteurs prépondérants dans divers modèles biologiques est un enjeu majeur des recherches en toxicologie. De par leur taille et leur structure, ces particules soulèvent encore des questions quant à leurs mécanismes d'action. De manière générale, l'évaluation des propriétés des substances est de la responsabilité des industriels et la prise en compte dans REACH au niveau de l'Union européenne doit être précisée.

Action : Évaluer l'exposition aux nanomatériaux dans les denrées alimentaires et réaliser des campagnes de mesures des nanomatériaux dans l'air extérieur des sites de fabrications.

Plan santé au travail

De réels progrès ont été accomplis dans notre pays comme en Europe en matière de sécurité, de prévention et de protection de la santé des travailleurs. Les entreprises conçoivent aujourd'hui que l'investissement dans l'amélioration des conditions de travail, pour une bonne qualité du travail, est une condition de durabilité de la performance économique. À ce titre, la lutte contre la pénibilité est un enjeu majeur partagé qui doit s'inscrire dans une politique plus globale d'amélioration des conditions de travail, de développement des compétences et des potentiels afin de valoriser l'homme au travail et par le travail. La prévention des risques professionnels permet d'améliorer non seulement les taux d'activité de la population en âge de travailler et l'état de santé des travailleurs, mais aussi la compétitivité des entreprises.

Cet élan doit être poursuivi et renforcé : le développement de la santé et du bien-être au travail et l'amélioration des conditions de travail constituent un enjeu majeur pour notre politique sociale dans les années à venir. Ceci passe par la mise en œuvre effective d'actions visant à réduire les accidents du travail et les maladies professionnelles, à prévenir les risques professionnels, l'usure au travail et la dégradation de la santé, ainsi qu'à permettre le maintien dans l'emploi.


Glossaire
A

Adjuvant	Se dit d'un produit que l'on ajoute à un autre pour en améliorer les caractéristiques.
Ag	Symbole chimique de l'argent métallique.
Agglomérat	Amas de particules ou d'agrégats faiblement liés dont la surface externe globale correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels.
Agrégat	Ensemble constitué de particules fortement liées.
Anatase	Voir <i>dioxyde de titane</i> .
Antigène	Molécule (naturelle ou synthétique) qui est reconnue comme étrangère par le système immunitaire et peut provoquer une réaction visant à l'éliminer.
Apoptose	Mécanisme de mort cellulaire programmée.
ARN	Acide ribonucléique qui joue un rôle clé dans le fonctionnement de la cellule.

C

CAS	Le numéro CAS délivré par le Chemical Abstract Service (CAS), une division de l'American Chemical Society (ACS), est une sorte de numéro d'immatriculation d'une substance. C'est le moyen d'identification de substances chimiques le plus universellement utilisé à ce jour. Par exemple le numéro CAS du chlorure de sodium est le 7647-14-5.
Cellule dendritique	Les cellules dendritiques sont des cellules du système immunitaire. Elles peuvent présenter des sortes de prolongements qui sont appelés des dendrites.
Cellule NK	Voir <i>leucocyte</i> .
Cd	Symbole chimique du cadmium.
CNDP	Commission nationale du débat public (www.debatpublic.fr).
CVD	Pour l'anglais « <i>chemical vapor deposition</i> », désigne le dépôt chimique en phase vapeur, procédé souvent utilisé pour déposer des films minces.
Cytokine	Substance synthétisée par une cellule du système immunitaire (ex. lymphocyte, macrophage) et agissant sur d'autres cellules immunitaires pour en réguler l'activité.
Cytoplasme	Partie interne de la cellule qui contient essentiellement de l'eau et des protéines.
Cytotoxicité	Propension d'un agent chimique ou biologique à être toxique pour les cellules.

D

Dioxyde de titane	Dans la nature, le dioxyde de titane (composé d'oxygène et de titane de formule TiO_2) se trouve principalement sous trois formes cristallines : rutile, brookite et anatase. Ces trois formes diffèrent par l'arrangement des atomes de titane et d'oxygène et n'ont pas exactement les mêmes propriétés. Depuis le début des années 1920, le dioxyde de titane est utilisé sous forme de poudre micrométrique (pigment blanc) pour ses propriétés opacifiante et blanchissante. Il est désormais utilisé sous forme micrométrique ou nanométrique dans une vaste gamme de produits comme les peintures, le papier, les cosmétiques, l'alimentation. Une autre application importante est dans les crèmes solaires sous forme nanoparticulaire, à cause de ses capacités d'absorption des rayons ultraviolets.
Dopamine	C'est un neurotransmetteur, c'est-à-dire une substance transmettant un signal entre neurones. La dopamine intervient de manières multiples dans le fonctionnement du cerveau.
DRIFT	Spectroscopie infrarouge par réflexion diffuse. C'est une technique dans laquelle on analyse le rayonnement infrarouge diffusé par un matériau. Elle est utilisée pour étudier les poudres.

E

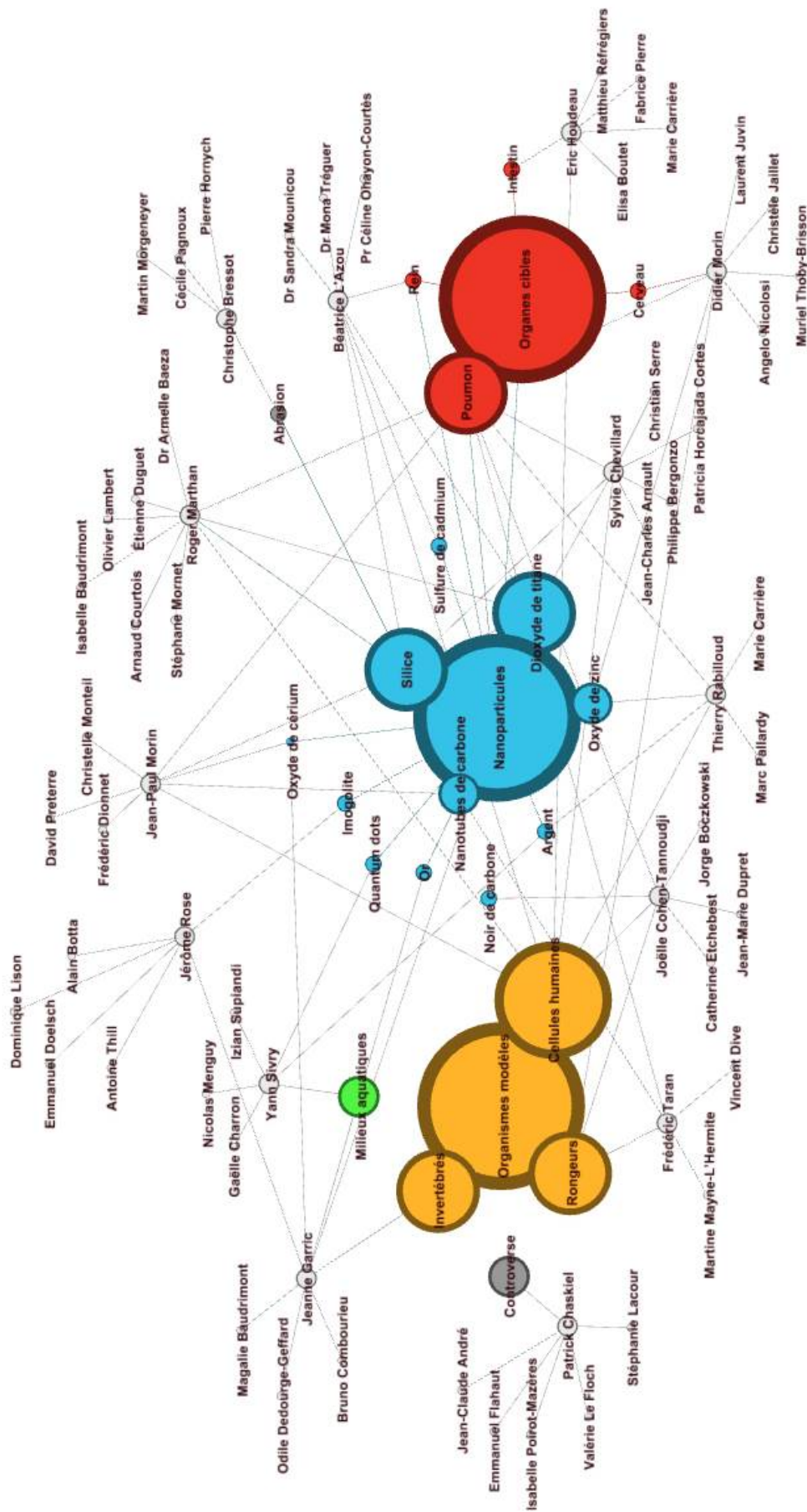
Endocytose	Mécanisme au cours duquel la membrane d'une cellule enveloppe une particule et la transporte vers l'intérieur de la cellule.
Endothélium	(gr. <i>endon</i> , dedans) tissu composé de cellules jointives qui recouvre la paroi interne des vaisseaux et du cœur.
Entérocytes	Cellules qui forment une couche de cellules sur la paroi interne de l'intestin.

Épithélium	(gr. <i>epi</i> , sur) tissu mince formé d'une ou de plusieurs couches de cellules jointives, ex. la couche superficielle de la peau (épiderme).
ERO	Espèces réactives de l'oxygène. Ce sont des espèces chimiques très réactives de par la présence d'électrons de valence non appariés. Par exemple le peroxyde d'hydrogène, l'ozone, le radical hydroxyle (OH) sont des ERO. Ces espèces réagissent avec les molécules présentes dans la cellule comme les protéines. Les ERO sont produites naturellement dans les cellules mais celles-ci contiennent des mécanismes de défense. Toutefois les ERO peuvent être produits en excès par exemple sous l'influence de rayonnements ionisants et la cellule peut être débordée. On parle alors de stress oxydant. On a montré que des ERO étaient produites à la surface de diverses nanoparticules ce qui est l'un de leurs mécanismes de toxicité.
F	
FDS	Fiche de données sécurité. C'est un document contenant des informations sur les propriétés d'une substance, en particulier sa toxicité.
Fullerène	Molécule formée d'atomes de carbone (il y en a de différentes tailles dont 60, 70, 84 atomes) formant un édifice qui rappelle un ballon de football. Leur diamètre est de l'ordre de un nanomètre.
G	
Génome	Ensemble du matériel génétique d'un individu.
Génotoxicité	Capacité d'une substance à induire des modifications physiques ou fonctionnelles dans un génome.
Gonades	Glandes sexuelles : l'ovaire est la gonade femelle, le testicule la gonade mâle.
Granulocyte	Voir <i>leucocyte</i> .
H	
HARN	En anglais " <i>High Aspect Ratio Nanoparticles</i> ". Ce sont des nanoparticules qui ont une dimension largement plus grande que les autres, par exemple des nanotubes de carbone.
Homéostasie	Maintien à un niveau constant, par les organismes vivants, des caractéristiques internes (ex. température, concentration en sel).
I	
ICP-MS	De l'anglais " <i>Inductively coupled mass spectrometry</i> ". Dans cette technique l'échantillon est ionisé dans un plasma produit par un champ radiofréquence. Les ions sont ensuite analysés par un dispositif qui les trie suivant leur masse de manière très sélective. On peut ainsi détecter des atomes présents en très basse concentration dans un échantillon.
Imogolite	Aluminosilicate où certains atomes de silicium sont remplacés par des atomes d'aluminium. Ce minéral se forme dans les sols volcaniques altérés.
Isotope	Chacun des différents types d'atomes associés à un même élément. Ils ne diffèrent que par leur nombre de neutrons et ont des propriétés chimiques quasiment identiques. Beaucoup d'éléments existent dans la nature sous la forme de plusieurs isotopes.
L	
Lymphocyte	Voir <i>leucocyte</i> .
Leucocyte	Les leucocytes ou globules blancs sont des cellules présentes dans le sang, la lymphe et divers organes et tissus. Ce sont des éléments importants du système immunitaire. Ils sont répartis en trois grandes familles : les granulocytes (ou polynucléaires), les lymphocytes et les monocytes. Certains leucocytes jouent un rôle dans la défense immédiate de l'organisme comme certains granulocytes qui absorbent les "intrus" ou les lymphocytes NK qui tirent leur nom de l'anglais "Natural Killer" (tueur naturel). Les cellules NK sont capables de tuer des cellules étrangères à l'organisme ou anormales. De même les monocytes se différencient en macrophages (du grec : « gros mangeur »), participent du système immunitaire en phagocytant des cellules abîmées ou des éléments étrangers (ex. bactéries). D'autres sont des acteurs importants de l'immunité acquise qui se manifeste lorsque l'organisme est en contact avec un intrus qu'il "connait déjà". Parmi elles, les lymphocytes

	B et T.
M	
Macrophage	Voir <i>leucocyte</i> .
MEB	Microscopie électronique à balayage. Dans cette technique, un fin faisceau d'électrons balaie la surface d'un objet. On analyse les électrons rétrodiffusés, ce qui permet de reconstituer une image en trois dimensions de l'objet. La résolution est de l'ordre du nanomètre.
MET	Microscopie électronique en transmission. Dans cette technique un fin faisceau d'électrons illumine un objet très mince. On forme l'image des électrons transmis. Cette technique donne accès à une résolution meilleure qu'un dixième de nanomètre.
Métrologie	Science des mesures.
Monocyte	Voir <i>leucocyte</i> .
MWCNT	En anglais " <i>Multi-walled Carbon Nanotubes</i> " ou nanotube multiparois (voir CNT).
N	
Nanomatériau	Selon la définition recommandée en 2011 par la Commission européenne, c'est un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 %, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm.
NTC ou nanotube de carbone	C'est un ensemble d'atomes de carbone en forme de tube. Ce tube peut avoir une paroi unique, on parle alors de nanotube simple paroi ou plusieurs emboîtées à la manière de poupées russes on parle alors de nanotubes multiparois. Son diamètre se mesure en nanomètres. La longueur peut être bien plus importante.
Noir de carbone (ou noir de fumée)	Fines particules de carbone produites par la combustion incomplète d'hydrocarbure. Le noir de carbone est utilisé par exemple comme pigment dans la fabrication des encres et du toner des photocopieuses, comme charge dans certains matériaux (notamment le caoutchouc des pneus...).
O	
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Économiques.
Organotypique	Une culture de cellules organotypique garde une organisation des cellules proche de celles dans un organe (architecture 3D, interactions).
P	
pH	Potentiel hydrogène. Ce chiffre est relié à la concentration en protons dans une solution aqueuse. Il mesure le caractère acide de cette solution. Plus il est bas, plus la solution est acide. Le pH de l'eau est de 7.
Phagocytose	Processus par lequel certaines cellules détruisent des particules ou d'autres cellules en les absorbant puis en les digérant.
Phénotype	Ensemble des caractères apparents d'un organisme (par opposition au génotype, expression des gènes).
R	
RFID	Système d'identification par radiofréquence. Il s'agit d'une puce susceptible de transmettre des informations. Ce genre de dispositif est par exemple utilisé dans des cartes fonctionnant sans contact.
Rutile	Voir <i>dioxyde de titane</i> .
S	
Silicose	Maladie pulmonaire provoquée par l'inhalation prolongée de poussière de silice.
SiO2	Oxyde de silicium (quartz).
Spermatogenèse	Formation des spermatozoïdes dans le testicule.
Stress oxydant (ou oxydatif)	Voir <i>ERO</i> .
Substance à l'état	Substance fabriquée intentionnellement à l'échelle nanométrique contenant des particules

nanoparticulaire	non liées ou sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont une proportion minimale des particules, dans la distribution des tailles en nombre, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm.
SWNT	En anglais " <i>Single-walled Carbon Nanotubes</i> " ou nanotube à simple paroi (voir CNT).
T	
Test de viabilité (cellulaire)	Test dans lequel on met des cellules en présence d'une substance dont on veut étudier la toxicité. Il en existe diverses variantes notamment en fonction de l'indicateur d'endommagement des cellules utilisé.
TiO2	Voir <i>dioxyde de titane</i> .
TIRFM	De l'anglais " <i>total internal reflection fluorescence microscope</i> " soit "microscope de fluorescence par réflexion totale interne". C'est une technique dans laquelle on éclaire un objet mince de manière particulière (à la limite de la réflexion totale) de manière à ne voir que sa surface. C'est par exemple une technique utile pour ne voir que la surface d'une cellule.
Transcriptome	Ensemble des ARN messagers contenus dans un type de cellule. C'est une image de la partie du génome qui est en cours de lecture.
Translocation	Migration des particules à partir de leur site de déposition. On utilise ce terme pour décrire la migration de nanoparticules d'un alvéole pulmonaire vers un autre organe.
U	
UV	Ultraviolets.
X	
XPS	Spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X. Dans cette technique, on irradie un échantillon avec un faisceau de rayons X. Les rayons X arrachent des électrons à la matière, et ces électrons sont ensuite analysés. Leur énergie étant caractéristique d'un élément chimique, cela permet de connaître la composition chimique de la surface.
Z	
ZnO	Oxyde de zinc.

Cartographie des projets valorisés



Mentions légales

Ce dossier a été réalisé par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) à l'occasion des Rencontres scientifiques organisées le 12 octobre 2015 sur le thème « *Exposition aux agents physiques et aux nouvelles technologies : quels effets sanitaires ?* » et dans le cadre de l'animation et de la valorisation du Programme National de Recherche en Environnement-Santé-Travail (PNR EST).

Nous remercions l'ensemble des contributeurs, et plus particulièrement Christel Cartier, Paulina Cervantès, Laurence Chevalier, Fabrice Coutureau, Laëtitia Dubois, Aude Estève, Sophie Guitton, Delphine Lascar, Gérard Lasfargues, Louis Laurent, Céline Leterq, Alima Marie, Olivier Merckel, Aurélie Niaudet, Jean-Nicolas Ormsby, Aurélie Pajon, Sophie Parel, Anne Tilloy.

Directeur de la publication :

Marc MORTUREUX (Directeur Général, Anses)


Conception et réalisation :

Nathalie RUAUX (Direction Recherche et Veille, Anses)

Remerciements pour les crédits photographiques :

Sauf mention contraire, les illustrations proviennent de la banque d'images Getty. Les photographies fournies par les chercheurs sont libres de droit et/ou disponibles selon les termes de la *Creative Commons Paternité version générique 2.5* ou versions ultérieures (inspirés des termes de la GNU Free Documentation Licence) : <http://creativecommons.org/licenses/>



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr  @Anses_fr

