



Substances chimiques et nanoparticules : modèles pour l'étude des expositions et des effets sanitaires

Dossier du participant

13
novembre 2013

Auditorium - Siège de l'Anses
Maisons-Alfort

Éditorial

Plus que jamais, dans une société où tout semble s'accélérer, qu'il s'agisse de modes de production, de technologies, de nouveaux produits ou d'usages, les besoins de connaissances nécessaires à l'évaluation et à la gestion des risques sanitaires constituent un grand défi pour le monde de la recherche et les agences sanitaires.

Ce sentiment d'accélération est d'autant plus marqué que la construction de connaissances a son rythme propre et ne peut répondre dans l'immédiateté aux incertitudes qu'alimentent les controverses, qu'elles soient scientifiques ou sociétales.

Dans ce contexte, la restitution du Programme national santé-environnement-travail se veut être un temps de pause, un temps de partage des connaissances récemment acquises. Elles sont aussi un lieu de partage entre les différents acteurs puisque ces rencontres sont ouvertes à toutes les parties prenantes : scientifiques, acteurs professionnels, acteurs associatifs, syndicats, pouvoirs publics.

Nous expérimentons d'ailleurs à l'occasion de cette édition un programme plus compact, se concentrant sur des projets de recherche, récemment terminés, sélectionnés par le Comité scientifique, avec un plus long temps de parole.

Le fil conducteur choisi par les membres du Comité scientifique pour la journée du 13 novembre 2013, est celui des modèles d'étude *in vivo* et *in vitro*, qui contribuent à mieux cerner les dangers liés à des contaminants qui font l'actualité. C'est ainsi que des résultats sur les perturbateurs endocriniens, la pollution de milieux de vie (air intérieur, sols, eau) et les nanoparticules, seront présentés.

Autant de sujets continuellement examinés par les directions d'expertise collective de l'agence. Elles auront aussi l'opportunité de présenter des travaux lors de deux conférences Anses inscrites au programme, l'une sur la question du devenir des polymères dans les sols, l'autre sur les résultats du projet européen sur la génotoxicité de nanoparticules.

Le souhait de l'Anses est que la restitution du programme national santé-environnement-travail d'aujourd'hui puisse stimuler le dialogue, permettre d'identifier les questions à la recherche et contribuer aux choix de décideurs politiques.

Marc MORTUREUX
Directeur général de l'Anses

Session 1

Substances chimiques : modèles *in vivo* et *in vitro*

Utilisation d'un modèle aviaire pour évaluer l'effet du nonylphénol sur le développement urogénital et sur les organes viscéraux

Benoît ROIG¹ ; Axelle CADIERE² ; Stéphanie BRESSIEUX² ; Sandrine FAURE² ; Pascal de SANTA BARBARA² ; Sandrine BIAU²

¹ Inserm U1045 IRSET-LERES, EHESP, Sorbonne Paris Cité, Rennes, France ; ² Inserm U1046, Université Montpellier 1 et 2, Montpellier, France. Contact : benoit.roig@unimes.fr

Objectifs

L'objectif du projet a été de déterminer, *via* l'utilisation d'un modèle embryonnaire aviaire, l'effet reprotoxique du nonylphénol (NP) à des concentrations compatibles avec l'exposition réelle des populations. Plus précisément, le projet a consisté à explorer la mise en place de la sphère urogénitale de l'embryon du poulet lorsque ce dernier a subi une nanoinjection de nonylphénol. L'observation des organes génitaux, le sexage, les analyses morphologiques, histologiques et fonctionnelles permettent d'évaluer cet effet. Les concentrations testées ont été choisies en fonction des données d'exposition réelle et de littérature scientifique.

Matériels et méthodes

Les expériences ont été réalisées chez l'embryon de poulet (*Gallus gallus domesticus*). Une injection de nonylphénol (20 µl de la solution dans le jaune) sont réalisés sur les œufs à 4 jours de développement (les gonades sont alors encore indifférenciées). Des concentrations de 50 et 10 µg par œufs sont injectées. Le développement est arrêté au 18^e jour et les embryons sont sacrifiés et disséqués. Le sexage est réalisé sur chaque embryon. Puis des analyses morphologiques, histologiques et immunohistochimiques sont effectués sur les tissus et organes génitaux. Des observations complémentaires ont également été réalisées sur le foie et le rein.

Résultats

Les résultats ont montré qu'en utilisant des doses fixes de NP (50 et 10 µg par injection dans l'œuf), peu de défauts morphologiques ont été observés.

Ces résultats ont montré peu de défauts morphologiques (pas de réversions sexuelles) aux doses de NP injectées, contrairement à ce qui avait été observé avec des estrogènes modèles (estradiol). En revanche, chez les mâles, une surexpression de la protéine SOX9 et une diminution du diamètre séminifère, marqueur d'un probable problème fonctionnel du testicule ont été observés. Ainsi, le potentiel œstrogénique du nonylphénol apparaît plus faible que celui des œstrogènes naturels et synthétiques, les effets qu'il provoque sur les organismes étant faible au niveau morphologique mais pouvant être significatif au niveau fonctionnel. En complément, nous avons également observé des modifications sur l'organisation rénale et des problèmes d'élimination ainsi que des défauts de la morphogénèse hépatique. Ces derniers résultats devront être confortés dans le futur.

Conclusion

Cette étude montre que le NP présente bien un effet reprotoxique en apparence inférieur à celui d'autres perturbateurs endocriniens. Cependant elle a également mis en exergue la nécessité de ne pas se concentrer uniquement sur les effets morphologiques des organes reproducteurs et de considérer des effets moléculaires, cellulaires et des effets sur la fonctionnalité des organes reproducteurs. Par ailleurs, notre étude a montré que l'ensemble de la sphère urogénitale était affectée ; des lésions rénales ayant été observées. Enfin, l'utilisation de l'embryon du poulet a permis de visualiser des effets sur d'autres organes, montrant ainsi que le mode d'action du NP ne serait pas uniquement sur le système endocrinien, aux concentrations environnementales mais peut également cibler d'autres organes.

Retombées sur le plan évaluation ou gestion des risques

Cette étude de faisabilité reste limitée dans l'exploitation des résultats, dans le sens où l'objectif premier était de valider l'utilisation du modèle de l'embryon du poulet. Les travaux réalisés permettent de montrer que l'embryon du poulet reste un modèle aussi intéressant que l'embryon de caille japonaise, utilisé également dans quelques études, en particulier pour sa facilité de manipulation, son temps de gestation relativement court et l'absence d'interférences (transmission) parentales (si l'on ne considère que l'œuf et pas les générations suivantes).

Les expérimentations réalisées ont permis d'aller plus loin et de mettre en évidence des résultats prévisibles (atteintes morphologiques faibles comparées à celles observées avec l'ethynylestradiol), peu attendues (atteinte fonctionnelle du testicule) mais également des originaux (atteintes rénales et hépatiques).

Du point de vue fondamental, ce projet conforte des résultats cités dans la littérature montrant que l'effet œstrogénique du nonylphénol est non comparable à celui d'œstrogènes plus puissants. D'autre part, il apporte également des connaissances complémentaires à l'existant quant aux effets du nonylphénol sur le système reproducteur (atteintes fonctionnelles et non macroscopiques) mais également quant à l'impact sur d'autres organes (organisation rénale et développement du foie).

Du point de vue appliqué, les résultats obtenus peuvent permettre d'alimenter les discussions concernant l'évaluation du risque qui devrait, notamment, prendre en compte d'autres effets que les perturbations endocriniennes, ainsi que de « nouveaux endpoints ».

Projet EST 2010-100, réalisé entre décembre 2010 et juin 2012 : « Evaluation de l'effet reprotoxique des nonylphénols ».

Signalisation œstrogénique non conventionnelle des alkylphénols dans les cancers testiculaires

Angelina WALLACIDES ; Hussein AJJ ; Sophie PINEL ; Amand CHESNEL ; Hélène DUMOND

CRAN/UMR 7039/CNRS, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France. Contact : helene.dumond@univ-lorraine.fr

Objectifs

Au cours des trente dernières années, les observateurs constatent un doublement des cas de cancer testiculaire chez les jeunes adultes dans les pays industrialisés. Ces altérations semblent dues à l'exposition à des xénobiotiques d'origines diverses, regroupés sous l'appellation de perturbateurs endocriniens.

Chez les individus exposés dès la vie fœtale à des composés chimiques analogues possédant une activité œstrogénique ou anti-androgénique, on observe un arrêt ou une modification du processus de différenciation des cellules germinales qui peuvent conduire au développement de pré-carcinome *in situ* (CIS).

Notre hypothèse est que, chez le jeune adulte, sous l'effet de stéroïdes et de perturbateurs endocriniens, les cellules de CIS prolifèrent et forment des tumeurs testiculaires.

Matériels et méthodes

Puisque les estrogènes et les androgènes sont des facteurs essentiels pour la différenciation de la lignée germinale mâle, nous souhaitons vérifier l'impact de micropolluants en mélange, mimétiques de ces molécules sur la vitesse de prolifération des tumeurs testiculaires.

Pour cela nous associons une étude *in vitro* sur les cellules TCam-2 et NTERa2/D1 (qui représentent respectivement les séminomes et les carcinomes embryonnaires) et une étude *in vivo* sur souris Nude xénogreffées pour (i) déterminer l'effet de micropolluants en mélange sur la prolifération et la différenciation des tumeurs et (ii) mettre en évidence de nouveaux marqueurs d'exposition à ces micropolluants.

Résultats

In vitro, nous avons tout d'abord caractérisé l'équipement en récepteur aux stéroïdes des cellules TCam-2 et NTERa2/D1 : elles expriment le récepteur aux androgènes, le récepteur nucléaire aux estrogènes ER β mais pas la forme longue du récepteur ER α . En revanche, une forme tronquée de 36kDa (ER α 36) est présente ainsi que le récepteur aux estrogènes couplé aux protéines G (GPER).

Nous avons ensuite montré que les hormones stéroïdes et le mélange M4 [4-nonylphénol : 4-tert-octylphénol] stimulent la prolifération des cellules séminomateuses TCam-2. La testostérone agit directement *via* un récepteur membranaire et en partie après son aromatisation par activation des voies œstrogéniques. L'effet de l'œstradiol dans ces cellules tumorales est dépendant de la présence du récepteur membranaire GPER qui active par la suite le récepteur ER α 36 localisé dans le cytoplasme *via* la voie AMPc/PKA. L'effet du mélange M4 dépend lui aussi de la présence d'ER α 36 mais le détail des cascades de signalisation impliquées reste à déterminer.

Nous nous sommes focalisés sur les effets du mélange M4 *in vitro* et *in vivo*. Nous avons développé un modèle original de xénogreffe chez la souris Nude et montré pour la première fois *in vivo* que le mélange considéré, à faible dose, stimule la croissance des tumeurs lors d'une exposition subchronique.

Enfin, grâce aux analyses réalisées par puces à ADN après traitement des cellules TCam-2 par le mélange M4, nous avons démontré les conséquences probables d'une exposition à ce mélange sur l'état de méthylation de l'ADN.

Conclusion

Les mélanges de micropolluants de type alkylphénols, ceux qui présentent un effet estrogénomimétique, sont susceptibles d'augmenter la vitesse de croissance des tumeurs testiculaires d'origine germinale. L'ensemble de nos résultats met en exergue le rôle central de ER α 36 dans les voies de signalisation stimulées par les mélanges étudiés. Il sera donc important de prendre en compte ces voies de signalisation non conventionnelles des estrogènes dans la future caractérisation d'un éventuel effet « œstrogéno-mimétique » des perturbateurs endocriniens.

Retombées sur le plan évaluation ou gestion des risques

Que ce soit, *in vitro* dans des expériences de culture cellulaire ou *in vivo* sur souris Nude xénogreffées, les doses de produits les plus « efficaces », c'est-à-dire celles qui induisent des effets prolifératifs les plus importants, sont toujours des doses faibles (de l'ordre du nanomolaire). Il est donc crucial de relever le risque encouru par les populations sensibles à ces doses, souvent considérées comme négligeable et inférieures aux NOEL.

Projet 2009-18, réalisé entre décembre 2009 et avril 2012 : « Influence des micropolluants en mélange sur la croissance de tumeurs testiculaires d'origine germinale ».



Etude de l'impact toxicologique d'efflorescences de cyanobactéries chez les poissons : exposition chronique et risques associés pour la santé humaine

Benjamin MARIE ; Marc EDERY ; Isabelle TRINCHET ; Cécile BERNARD ; Simone PUISEUX-DAO

UMR 7245 CNRS/Muséum national d'histoire naturelle (MNHN), Paris, France

Objectifs

Les objectifs du projet sont : 1) de déterminer les effets caractéristiques de la toxicité chronique des microcystines (MCs), cyanotoxines les plus fréquentes, à l'aide d'un organisme animal modèle alternatif de toxicologie, le poisson medaka ; 2) de comparer ces effets aux anomalies rencontrées chez certaines espèces de la faune piscicole prélevées dans le cadre de campagnes de pêche en Île-de-France dans des pièces d'eau présentant ou non des cyanobactéries productrices de MCs ; 3) d'analyser les mécanismes induits pouvant conduire à des dysfonctionnements cellulaires par une stratégie globale de protéomique ; 4) d'aborder, en intégrant les résultats des objectifs précédents, l'estimation d'un risque pour les populations humaines en fonction des usages des plans d'eau.

Matériels et méthodes

Les recherches comprennent : 1) une étude anatomo-pathologique accompagnée d'une étude de la bioaccumulation des MCs soit par immunolocalisation des MCs soit par quantification par spectrométrie de

masse (LC MS/MS) dans différents tissus du medaka et de poissons d'eau douce, 2) une analyse du protéome (protéomique différentielle hors gel) centrée sur le foie en raison de l'hépatotoxicité des MCs. Elles ont été conduites sur le medaka adulte avec la microcystine-LR, la plus fréquente et la plus toxique des MCs ainsi qu'avec des extraits d'efflorescences productrices de MCs ou d'un extrait non producteur. Les mécanismes d'action cellulaires de la MC-LR et des extraits d'efflorescences toxiques et non toxiques ont été analysés principalement dans le contexte *in vivo*/intoxication chronique.

Résultats

Le programme de recherche qui a été consacré à l'étude de contaminations chroniques des poissons par les cyanobactéries. Ont été conduites : d'une part des expériences d'une durée d'un mois sur le poisson medaka exposé *in vitro*, 1) à une des cyanotoxines les plus fréquemment rencontrées, la microcystine-LR (MC-LR), 2) à des extraits d'efflorescences de cyanobactéries ; d'autre part des expositions d'un mois *in situ* de medakas en cage dans un lac présentant des efflorescences saisonnières de *Microcystis* productrices de MCs. Ces expérimentations ont permis de mettre en évidence des atteintes au niveau de plusieurs organes principalement foie et organes reproducteurs ainsi que des modifications des processus cellulaires et moléculaires induites par la MC-LR dans le foie chez les adultes de medakas traités de façon chronique avec notamment des réactions au stress induites par la toxine.

En outre, différentes espèces de poissons d'eau douce en exposition chronique dans l'environnement à des efflorescences à *Planktothrix* et à *Microcystis* productrices de microcystines dans divers lacs de la région Ile-de-France ont montré des modifications anatomopathologiques similaires à celles observées chez les medakas dans les conditions décrites plus haut. Les résultats les plus originaux concernent la mise en évidence d'effets reprotoxiques d'intensité variable selon les espèces ; cette variabilité est retrouvée au niveau de l'immunolocalisation ou de la quantification (par spectrométrie de masse ; LC MS/MS) des microcystines dans les tissus de ces poissons.

Conclusion

Les atteintes observées au niveau de plusieurs organes principalement foie et organes reproducteurs ainsi que les modifications des processus cellulaires et moléculaires induites par la MC-LR ou les extraits d'efflorescences de cyanobactéries suggèrent que la production de microcystines puisse avoir des conséquences sur la biodiversité des populations de poissons. De plus, une donnée acquise au cours de ce projet démontre la présence de microcystines dans les muscles de poissons des sites étudiés ce qui pose le problème de risques potentiels pour la santé humaine après consommation de poissons contaminés.

Retombées sur le plan évaluation ou gestion des risques

Compte tenu, 1) de la diversité des espèces de poissons analysées et du nombre important (93) d'animaux étudiés suggérant des atteintes fréquentes dans les poissons des lacs contaminés, 2) des sites de campagne de pêche très fréquentés par l'Homme pour des usages variés, 3) des effets observés chez les poissons, vertébrés dont les réponses toxicologiques présentent des analogies avec celles rencontrées chez les vertébrés supérieurs, il nous paraît utile de souligner l'intérêt de ces études quant aux risques potentiels des cyanobactéries; déductibles pour la santé humaine, en particulier à travers la consommation de poissons contaminés.

Projet EST 2010-002, réalisé entre décembre 2010 et juillet 2013 : « Étude de l'impact toxicologique d'efflorescences de cyanobactéries chez les poissons, exposition chronique et risques associés pour la santé humaine ».

Exposition cutanée aux produits chimiques : effets des vêtements de protection sur la perméation cutanée

David VERNEZ

Département hygiène du travail. Institut universitaire Romand de Santé au Travail. Suisse

Projet PNR-EST 2010-26

Résumé non disponible.

Développement d'un modèle cellulaire prédictif du rôle des polluants du milieu intérieur dans la survenue et la sévérité des allergies respiratoires

Pierre Edouard KASTNER^{1,2} ; Anne CASSET² ; Wuiyn ZHENG² ; Stéphane Le CALVE² ; Françoise PONS^{2,3}

¹Laboratoire de conception et application de molécules bioactives, UMR 7199 CNRS/Université de Strasbourg ; ²Laboratoire des matériaux, surfaces et procédés pour la catalyse, UMR 7515 CNRS/Université de Strasbourg ; ³Laboratoire CAMB, UMR 7199, Faculté de pharmacie, Illkirch. Contact : pons@unistra.fr

Objectifs

L'air intérieur renferme de nombreux polluants dont les effets sur la réponse à l'allergène sont mal connus. Les besoins de connaissance sur ces effets concernent les polluants pris individuellement, mais également leurs mélanges. Les effets des polluants sur la réponse à l'allergène pourraient résulter d'une action sur l'épithélium respiratoire. En effet, cette structure joue un rôle majeur de défense du poumon, en formant une barrière imperméable, en assurant le piégeage et la clairance des toxiques inhalés et en produisant des médiateurs régulant l'inflammation, la réponse immunitaire ou la réparation tissulaire. Ainsi, l'objectif du projet était de développer un modèle cellulaire permettant d'évaluer l'impact de polluants du milieu intérieur sur la réponse à l'allergène.

Matériels et méthodes

Le travail s'est organisé en 2 tâches : 1) la conception d'un système permettant d'exposer des cellules en culture à des concentrations connues, stables et reproductibles en polluants gazeux, et 2) l'étude de l'effet aigu et répété de polluants majeurs de l'air intérieur, seuls ou en mélange, mais également associés à des allergènes respiratoires, sur des marqueurs cellulaires et moléculaires des différentes fonctions de défense de l'épithélium respiratoire, dans plusieurs modèles cellulaires. Les polluants choisis pour cette étude sont deux polluants gazeux, le formaldéhyde (HCHO) et le dioxyde d'azote (NO₂), et un polluant biologique, les endotoxines. Les allergènes respiratoires choisis pour mimer la réponse à l'allergène sont les allergènes d'acariens.

Résultats

Le système conçu permet d'exposer des cellules en culture au HCHO et au NO₂ gazeux, seuls ou en mélange. La génération et la mesure des polluants dans le système se fait en temps réel. Les cellules peuvent être exposées aux polluants de façon unique ou répétée, à l'interface air-liquide ou en mode immergé, pendant des temps allant de 30 min à 2 h. Dans ce système, une exposition unique, de 30 min à l'interface air-liquide ou de 2 h en mode immergé, à des concentrations élevées en HCHO (200 µg.m⁻³) et NO₂ (800 µg.m⁻³) au regard des concentrations moyennes retrouvées en milieu intérieur n'a pas eu d'effet sur l'intégrité et les fonctions de barrière et d'immunorégulation de cellules épithéliales bronchiques, nasales ou alvéolaires, en cultures confluentes ou non confluentes. En revanche, les expositions répétées (30 min/jour pendant 4 jours) au mélange HCHO et NO₂ gazeux ont eu des effets significatifs sur ces réponses. A titre comparatif, les effets du HCHO solubilisé (70 -7000 µM) ont été caractérisés dans deux lignées cellulaires, suite à une exposition à court-terme (30 min ou 24 h) ou à long-terme (4 semaines). L'étude à court-terme a montré que le HCHO solubilisé est capable d'interférer avec l'intégrité et la fonction d'immunorégulation de l'épithélium respiratoire de manière dose-dépendante, mais que seules des expositions de plusieurs heures à des concentrations en HCHO bien au delà des concentrations physiologiques sont susceptibles d'induire des lésions de l'épithélium respiratoire. L'étude à long-terme (exposition journalière de 30 min à 70 µM de HCHO) n'a pas montré d'effet direct du HCHO, ni d'effet du polluant sur les réponses induites par les endotoxines.

Conclusion

Ce travail a permis la conception d'un système d'exposition de cellules en culture à deux polluants majeurs du milieu intérieur, le HCHO et le NO₂, et la mise en place de modèles cellulaires qui ont été utilisés pour étudier les effets sur la réponse à l'allergène de ces polluants, seuls ou en mélange, suite à des expositions uniques ou répétées. Nos résultats ont suggéré, en accord avec la littérature, que seules des concentrations gazeuses très élevées en HCHO ou en NO₂, ou des expositions répétées à ces polluants sont capables d'altérer l'intégrité et les propriétés d'immunorégulation de l'épithélium respiratoire. Ces résultats n'excluent pas que le HCHO et le NO₂ jouent un rôle dans les allergies respiratoires et l'asthme, aux concentrations classiquement mesurées en air intérieur.

Retombées sur le plan évaluation ou gestion des risques

Ce projet a abouti à la mise en place et la caractérisation d'outils nécessaires à l'étude et la compréhension du rôle de la pollution intérieure dans la survenue et la sévérité des allergies respiratoires, l'analyse de la part respective des différents polluants dans cet effet, mais également la mise en évidence d'éventuels effets additifs ou synergiques entre ces polluants. Dans l'avenir, ces outils pourront être utilisés pour l'étude de polluants ou de mélanges gazeux autres que ceux évalués au cours de ce projet. La réalisation de ce projet nous a également permis d'identifier plusieurs axes de recherche à explorer pour améliorer notre outil d'étude de l'impact de la pollution intérieure sur la santé respiratoire.

Projet 2009-30, réalisé entre décembre 2009 et décembre 2012 : « Développement d'un modèle cellulaire prédictif du rôle des polluants du milieu intérieur dans la survenue et la sévérité des allergies respiratoires ».

Actualité sur les polymères de synthèse présents dans les produits destinés à finir leur vie dans les sols agricoles

Emmanuel GACHET ; Thérèse SIX ; Arnaud BOIVIN

Anses, Maisons-Alfort, France. Contact : emmanuel.gachet@anses.fr

Objectifs

Actuellement, de nombreux polymères sont utilisés pour des usages agricoles et certains d'entre eux sont présents dans des matières fertilisantes ou supports de culture. Parmi ces produits, certains font l'objet d'une évaluation par l'Anses et d'une décision d'homologation avant mise sur le marché. En réponse à une saisine de la DGPAAT¹ (2009-SA-0001) portant sur l'analyse critique des méthodes d'évaluation des impacts environnementaux et des méthodes d'évaluation de l'écotoxicité des polymères de synthèse intégrés dans les produits à usages agricoles, l'Anses a exécuté une revue de la bibliographie sur le sujet.

Matériels et méthodes

Etude bibliographique menée dans le cadre d'un master de 2^e année.

Résultats

Ce travail a porté sur les polymères de synthèse les plus pertinents au regard de leur utilisation dans les matières fertilisantes et supports de culture, à savoir, par exemple, les polyacrylamides utilisés comme floculants/desséchants dans les stations d'épuration et les polyoxyéthylènes et polyoxypropylènes utilisés comme agents mouillants/conditionneurs de sols.

Il en ressort que très peu de données font l'objet de publications sur le devenir de ces polymères dans l'environnement. Il n'est donc pas possible de conclure sur l'état de dégradation atteint, ni d'estimer les concentrations dans le sol et dans l'eau.

Conclusion

L'Anses s'est donc engagée dans le financement d'un projet de recherche en plusieurs volets : en première instance, l'Agence a chargé le CNRS (Lyon) de mettre au point les méthodes d'identification et de quantification de ces polymères (2 floculants et 2 agents mouillants) et de leurs sous-produits. Le deuxième volet de ces travaux de recherche s'attachera à étudier la dégradation de ces polymères en situation accélérée en laboratoire, conditions reflétant celles du terrain ; il s'agira d'extraire et de doser les polymères et leurs produits de dégradations dans différents sols.

¹ - DGPAAT : Direction générale des politiques agricole, agroalimentaires et des territoires

SESSION 2

Nanoparticules : données récentes

Conférence introductive

Résultats du programme européen Nanogenotox : génotoxicité des nanomatériaux

Nathalie THIERIET

Anses, Maisons-Alfort, France

Lancé en mars 2010 et coordonné par l'Anses, Nanogenotox a rassemblé 30 partenaires (organismes scientifiques et ministères) issus de 13 États-membres de l'Union européenne. Son objectif était de fournir à la Commission européenne et aux États membres une méthode rigoureuse et fiable de détection du potentiel génotoxique des nanomatériaux manufacturés susceptibles d'engendrer des cancers ou une reprotoxicité chez l'homme. Dans ce cadre, quatorze nanomatériaux manufacturés, choisis en fonction de leurs usages possibles dans différents types de produits (cosmétiques, aliments, produits de consommation courante) et de leurs voies d'exposition potentielles (orale, cutanée, inhalée), ont été soumis à étude.

A cette occasion, des nombreuses données scientifiques ont été produites. Les travaux issus du projet ont permis de réaffirmer la nécessité d'une caractérisation physique et chimique complète et fiable des matériaux bruts et dispersés. Nanogenotox a proposé des procédures standardisées pour cette caractérisation ainsi qu'un protocole de dispersion commun. A partir des résultats, des adaptations des lignes directrices de tests *in vitro* et *in vivo* de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) ont été proposées. Nanogenotox a également permis de confirmer qu'il est impossible de classer comme « monosubstance » les familles de nanomatériaux manufacturés analysées. En effet, au sein d'une même famille, des différences ont été constatées quant à la caractérisation physique et chimique, la génotoxicité *in vitro* et *in vivo*, de même que les paramètres toxicocinétiques.

Pour en savoir plus :

Notre dossier sur les nanomatériaux : <http://www.anses.fr/fr/content/nanomat%C3%A9riaux>

Le site de Nanogenotox (en anglais uniquement) - <http://www.nanogenotox.eu>

NanoADAPT : étude de la réponse adaptative des cellules rénales aux nanoparticules inorganiques

Béatrice L'AZOU¹ ; Isabelle PASSAGNE² ; Sandra MOUNICOU³ ; Mona TREGEUR³ ; Céline OHAYON⁴

¹Université de Bordeaux, Bordeaux 2, FRE 3396 Pharmaco-chimie, Bordeaux, France ; ²LCABIE, CNRS UMR 5254, UPPA, Pau, France ; ³Université de Bordeaux, ICMCB, Bordeaux1, Pessac, France ; ⁴Université de Bordeaux, LHE, Bordeaux, France.

Contact : beatrice.lazou@u-bordeaux2.fr

Objectifs

A l'échelle nanométrique, la matière acquiert des comportements spécifiques, exacerbant leur réactivité chimique, leur comportement électronique ou magnétique, ou encore, leur potentiel de pénétration dans les organismes vivants, mais aussi leur réactivité biologique. Il convient alors d'étudier l'impact et le comportement des nanoparticules (NPs) dans les organismes exposés.

Le rein constitue l'un des organes cibles, du fait de ses fonctions de filtration du sang, de transport et de réabsorption. Mais les données toxicologiques sont encore insuffisantes pour confirmer ou non la toxicité des NPs. Des modèles *in vitro*, comme les cultures de cellules rénales sont donc proposés pour apprécier les mécanismes toxiques et établir des hypothèses du mode d'action des NPs.

Matériels et méthodes

Dans cette étude de faisabilité, nous avons proposé d'étudier *in vitro*, les effets induits par des NPs de TiO₂, de CdS et de SiO₂ et de tester des protéines (enzymes, ligands, ...) comme biomarqueurs suite à l'exposition de ces NPs. Deux lignées cellulaires rénale, saines (HK-2) ou issues d'un carcinome (O-786) ont été utilisées afin d'évaluer les effets potentiels des NPs sur la cible rénale et de tenir compte de l'état physiologique cellulaire. Une partie des effets des NPs résulte d'un stress oxydant avec production excessive d'espèces réactives de l'oxygène. Outre cette production à l'origine de dommages cellulaires, la cellule est pourvue d'enzymes anti-oxydantes capable d'éliminer des radicaux libres. Ces systèmes peuvent être identifiés comme des indicateurs potentiels d'exposition.

Résultats

Les tests de cytotoxicité mettent en évidence pour les NPs de CdS et de SiO₂ un effet dose-dépendant, plus important sur la lignée O-786 montrant une plus grande sensibilité de la lignée cancéreuse. L'implication du stress oxydant est confirmée et une induction d'enzymes anti-oxydantes (GSTpi) traduit une adaptation de la cellule. Ce système est dépassé pour les NPs cytotoxiques. Pour CdS, une prise en charge du Cd est observée par des bioligands (MTs). Aucune modification significative d'enzymes relarguées (γGT ou NAG) n'a été observé aux concentrations utilisées (non cytotoxiques). Cependant, KIM-1 est décrit sensible marqueur tubulaire. La spectrométrie infrarouge (IR-TF) est introduite comme une méthode sensible détectant une lipoperoxydation à faibles concentrations.

Conclusion

L'approche méthodologique décrite dans cette étude permet *via* l'identification de biomarqueurs de mieux relier la présence du nanomatériau et l'apparition d'une réponse biologique essayant ainsi de corrélérer la notion d'exposition à celle d'effet.

Retombées sur le plan évaluation ou gestion des risques

La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) a été introduite comme une méthode

sensible nous permettant de détecter une lipoperoxydation à faibles concentrations. L'analyse des données spectrales obtenues par IR-TF a permis de révéler de subtils changements de la composition moléculaire de l'échantillon après exposition aux NPs par rapport aux cellules témoins. Cette technique est aujourd'hui décrite comme étant l'une des techniques les plus sensibles. Ainsi, la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) peut être considérée comme une technique complémentaire des méthodes conventionnelles d'étude en mécanistique. L'approche toxicologique a permis, de tester divers biomarqueurs, en utilisant des méthodes alternatives pour modéliser et évaluer la toxicité des substances comme les NPs, susceptibles d'avoir un impact sur la santé.

Projet EST 2010-87, réalisé entre janvier 2011 et juin 2012 : « NanoADAPT : étude de la réponse adaptative des cellules rénales aux nanoparticules inorganiques ».

Translocation de nanotubes de carbone dans des organes secondaires après exposition pulmonaire chez la souris

Bertrand CZARNY¹ ; D. GEORGIN¹ ; F. TARAN¹ ; F. BERTHON¹ ; P. CARMELLE² ; Sophie LANONE² ; Vincent DIVE¹

¹CEA, Service d'ingénierie moléculaire des protéines et Service de chimie biologique et moléculaire, CE-Saclay, Gif-sur-Yvette ;

²Inserm U955, faculté de médecine, Créteil. Contact : sophie.lanone@inserm.fr

Objectifs

Les nanotubes de carbone (CNT) sont constitués d'une ou plusieurs feuilles de graphite enroulées sur elles-mêmes. Leur diamètre est de l'ordre du nanomètre et ils peuvent mesurer jusqu'à plusieurs dizaines de microns de long. Leurs nombreuses propriétés les rendent particulièrement attractifs dans de nombreux domaines, mais posent des questions sur leur potentielle toxicité. L'objectif général du projet était d'étudier la translocation pleurale et la biodistribution de nanotubes de carbone, après exposition pulmonaire chez la souris. Plus spécifiquement, il s'agissait i) de synthétiser et caractériser des nanotubes de carbone marqués au ¹⁴C ; ii) de suivre, au cours du temps, ces nanotubes radiomarqués par analyse en radioimagerie après exposition de souris par voie pulmonaire.

Matériels et méthodes

Des nanotubes de carbone radiomarqués au C¹⁴ ont été synthétisés selon un procédé chimique en phase vapeur en utilisant comme source ce carbone du benzène C¹⁴. Après caractérisation et dispersion en solution, des souris ont été exposées par voie pulmonaire et suivies pendant 9 mois. A différents temps (4 souris par groupe), les animaux ont été sacrifiés afin de préparer des coupes de tissus des différents organes. Ces coupes de tissus ont été analysées par radioimagerie quantitative pour détecter la présence de nanotubes de carbone dans d'autres organes que le poumon. Dans le cas de présence de radioactivité, des expériences d'extraction ont été menées afin de caractériser la nature des composés responsables de cette radioactivité.

Résultats

Les expériences de radiomarquage par un procédé CVD ont été réalisées permettant ainsi d'obtenir des nanotubes de carbone (CNT) incorporant des atomes C^{14} dans certaines positions, permettant de ne pas altérer la structure des nanotubes et donc d'étudier la biodistribution de ces particules sans altération de leur structure. L'incorporation du benzène C^{14} a pu être réalisée à un très bon niveau permettant d'obtenir une radioactivité spécifique, qui couplée à une technique de détection par radioimagerie débouche sur une limite de détection de l'ordre d'un picogramme de CNT, soit environ 100 nanotubes. L'analyse de la rate et du foie montre que dès 7 jours après administration des CNT, de la radioactivité peut être détectée dans ces organes. Le temps passant, on voit une augmentation continue de la radioactivité dans ces deux organes et en parallèle une décroissance de la radioactivité au niveau du poumon. Grâce à des expériences d'extraction sur les tissus et caractérisation par microscopie électronique, nous pouvons conclure que la radioactivité peut être attribuée sans ambiguïté à la présence des CNT dans la rate et le foie. D'autant qu'en parallèle, aucune radioactivité n'a pu être détectée dans les urines, excluant l'existence d'un métabolisme des CNTs dans les organes. Ces expériences nous permettent de conclure à l'existence d'une translocation des nanotubes du poumon vers la rate et le foie, la rate étant l'organe cible dans nos expériences. Nos travaux peuvent être critiqués par le mode d'exposition correspondant à une administration en bolus rapide des CNT dans le poumon et non pas à un mode d'administration si nous avons précédé à une exposition par inhalation.

Conclusion

Nos travaux démontrent que les CNT sont capables de franchir des barrières épithéliales au niveau pulmonaire et donc au cours du temps s'accumuler dans des organes secondaires, notamment la rate. Ces travaux mériteraient d'être poursuivis en mettant en place un mode d'administration par inhalation, correspondant à un mode de contamination plus réaliste pour l'homme. Si nos données étaient avérées, il faudra conclure qu'en plus des pathologies pulmonaires, d'autres organes pourraient être concernés par l'exposition aux CNT, d'autant qu'après nos données, ces organes secondaires semblent se remplir en fonction du temps sans élimination des CNTs. Des souris devront être suivies sur des temps beaucoup plus longs (2 ans) afin de vérifier si une élimination des CNTs peut exister.

Retombées sur le plan évaluation ou gestion des risques

L'existence d'une translocation des CNT vers des organes secondaires chez la souris suite à une exposition pulmonaire indique la nécessité absolue de protéger les personnes sur les sites production des CNT de ce type de contamination et de sécuriser ces sites de production afin d'éviter toute contamination possible de l'atmosphère.

Projet PNR-EST 2009-90, réalisé entre juillet 2009 et juillet 2012. « Étude de la translocation pleurale de nanotubes de carbone ».

Développement de méthodes de mesure des propriétés barrières des membranes polymères et textiles contre les nanoparticules en milieu liquide - Application aux vêtements et aux gants de protection

C. BROUARD¹ ; H. PERCHE¹ ; S. MOTELLIER¹ ; A. AUGER¹ ; V. BARTHES¹ ; S. DERROUGH¹ ; L. GOLANSKI¹ ; L. VINCHES² ; M. BEN SALAH² ; S. HALLÉ² ; P. DOLEZ² ; K.J. WILKINSON²

¹CEA, DRT/LITEN/DTNM/LCSN, Grenoble, France ; ²Équipe de recherche en sécurité du travail (ÉREST), École de technologie supérieure, Montréal (QC), Canada. Contact : sylvie.motellier@cea.fr

Objectifs

Ce projet vise à concevoir des méthodes génériques de mesure de la pénétration des nanoparticules en milieu liquide applicables à la qualification de matériaux barrières : gants, vêtements de protection, géomembranes pour le stockage des déchets, etc. L'application choisie dans ce projet concerne les matériaux utilisés pour les équipements de protection individuelle (EPI), et plus particulièrement les membranes polymères et textiles.

- Conception de montages
- Évaluation des performances des méthodes disponibles pour l'analyse des NP
- Étude de l'efficacité d'une série de matériaux (gants et blouses) vis-à-vis de la pénétration pour un certain nombre de NP en suspension
- Analyse de l'effet des sollicitations mécaniques et environnementales sur la pénétration des NP en suspension

Matériels et méthodes

Les deux équipes (française et canadienne) ont procédé avec des dispositifs de mesure différents. La première équipe a utilisé le concept de cellule de diffusion de type « à travers », généralement bien adaptée à la détermination des coefficients de diffusion pour des matériaux peu diffusifs. Dans ce montage, les deux faces de l'échantillon sont en contact avec le milieu aqueux. La seconde équipe a conçu deux dispositifs comprenant une cellule composée d'une chambre d'exposition et d'une chambre d'échantillonnage qui sert aussi de chambre physiologique. Dans ces montages, seule la face amont de l'échantillon est en contact avec le milieu aqueux. Tous les dispositifs ont été équipés de systèmes de déformation biaxiale dynamiques. Les analyses ont été effectuées par ICP-MS, TXRF ou MEB.

Résultats

Les essais de l'équipe française ont montré une diffusion non nulle d'eau tritiée à travers les quatre matériaux testés (latex, nitrile, vinyl et polyéthylène). Les coefficients de diffusion sont compris entre $1.4 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ pour le polyéthylène et $5.2 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ pour le vinyle. Il n'a pas été mesuré de nanoparticules en aval des échantillons (concentration inférieure à la limite de détection de la méthode analytique) dans les conditions testées (différentes sollicitations mécanique, gradient de T°, sels simulant la sueur, sollicitations croisées) et ce pour des particules de 15 à 100 nm. Les tests effectués par l'équipe canadienne avec des NP de TiO₂ et sous contrainte mécanique montrent un effet de gonflement, des modifications de comportement mécanique et d'état de surface des matériaux. Une légère augmentation de la concentration en Ti en aval de l'échantillon (gants nitrile et latex) a pu être mesurée, indiquant un passage possible des nano TiO₂. De même, un échantillon de polyéthylène (matériau combinaison) semble montrer une possible pénétration de NP de TiO₂ après quelques heures d'exposition.

Conclusion

L'équipe française et l'équipe canadienne n'aboutissent pas à la même conclusion à la suite de cette étude. En effet, l'équipe française n'a pas mis en évidence un éventuel passage des nanoparticules de TiO_2 à travers les membranes en nitrile des gants de protection, et ce, quelle que soit la sollicitation imposée. L'équipe canadienne a, quant à elle, montré une possibilité de passage de ces particules dans le cas de membranes nitrile, latex ainsi que dans le cas de combinaisons en polyéthylène.

Plusieurs paramètres peuvent expliquer ces différences : le montage expérimental, le type de sollicitation, ou encore les techniques analytiques différentes entre les deux équipes.

Retombées sur le plan évaluation ou gestion des risques

Même si les résultats obtenus sur l'efficacité des gants et des vêtements de protection contre les nanoparticules sont encore préliminaires, les possibilités de passage de nanoparticules à travers les gants amènent à recommander la prudence en ce qui concerne le choix et les conditions d'utilisation des gants et des vêtements de protection en cas d'exposition aux nanoparticules. Une poursuite des travaux devrait permettre de donner des indications plus précises sur les niveaux de protection offerts et sur les conditions d'utilisation sécuritaire des gants et des combinaisons en présence de nanoparticules.

Projet EST 2009-19, réalisé entre janvier 2011 et décembre 2012. « Développement de méthodes de mesure des propriétés barrières des membranes polymères et textiles contre les nanoparticules en milieu liquide - Application aux vêtements et aux gants de protection ».

Etude du relargage par abrasion de nanocharges dans l'air à partir de matrices polymères

A. GUIOT¹ ; S. MOTELLIER² ; L. GOLANSKI¹ ; J. DUCHET²

¹CEA, DRT/LITEN/DTNM/LCSN, Grenoble, France ; ²Ingénierie des matériaux polymères - UMR 5223 CNRS, INSA Lyon, Villeurbanne, France. Contact : luana.golanski@cea.fr

Objectifs

Ce projet vise à optimiser un banc de test de relargage de nanocharges par les nanomatériaux sous différentes sollicitations (chocs mécaniques, rayures et abrasion). Une étude d'extraction de nanocharges de la matrice par abrasion a été effectuée. Le rôle de l'état de dispersion des « multi wall nanotubes de carbone » (MWNTC's) sur l'extraction de nanocharges a été évalué.

Matériels et méthodes

Différents échantillons polymères ont été abrasés : PA6 (polyamide), PC (polycarbonate) chargés en MWNT, époxy non chargé, époxy MWNTC 0.8 % wt dispersé avec le mélangeur 3 rouleaux, époxy /MWNTC

0,8 % wt non-prédispersé. Différentes sollicitations (chocs mécaniques, rayures et abrasion) ont été appliquées à l'aide des différents outils : pointe vibrante, râpeaux, brosse mécanique et Taber linéaire. Pour la détection et classification de nanoaérosols suivant leurs tailles, on a utilisé un ELPI (Electrical Low Pressure Impactor). Des prélèvements des poussières ont été effectués sur des filtres ELPI pour des analyses au MEB (Microscopie électronique à balayage). Un système permettant de collecter les particules abrasées sur des grilles TEM (Transmission Electron Microscopy) a été utilisé.

Résultats

Une augmentation significative du nombre de nano poussières relarguées par abrasion a été mesurée pour l'échantillon chargé en MWNTC par rapport à la référence, ce qui pourrait être expliqué par une dureté plus importante de l'échantillon sans charge. L'effet du papier abrasif est apparu différent sur polymère PA6 par rapport à PC : plus de nano poussières ont été émises par les échantillons PA6. Il est possible d'obtenir un relarguage qui tend vers zéro si l'état de dispersion des MWNTC est bien contrôlé. Dans le cas d'un époxy présentant une mauvaise dispersion, on a observé des nanotubes de carbone affleurant et dépassant des bords de particules de polymères de tailles variables.

Conclusion

Aucun relarguage de MWNTC libre n'a pu être observé sur ces échantillons abrasés en utilisant l'outil standard Taber linéaire (résistance à l'abrasion) et les papiers abrasifs en SiC dans les conditions de sollicitations proches de la norme. D'autres contraintes mécaniques d'abrasion, rayures et chocs mécaniques ont été appliquées sur époxy modèle. Il est possible d'obtenir un relarguage des MWNTC qui tend vers zéro si l'état de dispersion des MWNTC est bien contrôlé, même en utilisant ces outils en conditions dégradées. Un nanocomposite contenant des agglomérats de MWNTC génèrera ces particules à nanotube affleurant en nettement plus grande quantité.

Retombées sur le plan évaluation ou gestion des risques

L'idée principale ressortant de cette étude et la nécessité de mettre en place une procédure standardisée (par le biais d'une norme notamment), procédure qui se voudrait aussi représentative que possible du cycle de vie d'un nanocomposite. Cette procédure permettrait alors de générer une base de données en fonction des différents types de matrice et de nanoparticules et identifier les paramètres des nanocomposites ayant le plus d'impacts sur le relarguage de nanocharges.

Partenaires du PNR-EST

