

Nanoparticules produites intentionnellement : dangers et risques sanitaires

Évaluation de la toxicité des nanomatériaux : fiabilité/pertinence des techniques *in vitro* couramment utilisées et nouvelles pistes méthodologiques

Période : décembre 2008 à mars 2009

Isabelle PASSAGNE

Université Victor Segalen Bordeaux 2 – Laboratoire Santé, Travail, Environnement EA3672 ISPED - Bordeaux

Mots clés : Cytotoxicité, Méthode *in vitro*, Nanomatériaux, Nanoparticules, Nanotubes, Toxicité

Face à l'avènement des nanotechnologies ces dernières années, la production de nanoparticules en grande quantité risque d'entraîner des conséquences importantes sur la santé des travailleurs, exposés de manière chronique, et sur celle de la population générale, exposée de façon indirecte. Les nanomatériaux possédant des propriétés physico-chimiques très diverses, il s'avère nécessaire d'évaluer au mieux les effets biologiques engendrés sur les organes et les cellules, via le développement de méthodes *in vitro* appropriées. En effet, les études évaluant des effets cytotoxiques des nanoparticules sur des cellules d'origines variées révèlent le problème de la fiabilité des tests utilisés. Actuellement, la majorité des tests de cytotoxicité mesure la viabilité cellulaire via l'utilisation d'indicateurs colorés comme le MTT¹ ou le rouge neutre, rendant compte de l'activité métabolique ou de l'intégrité membranaire de la cellule. Cependant, Wörle-Knirsch *et al.* (2006) ont démontré que certains nanomatériaux de carbone, du fait de leur propriété absorbante, pouvaient interférer avec certains colorants utilisés dans les tests précités.

Limite et efficacité relative des tests *in vivo* utilisés en nanotoxicologie

Devant les résultats discordants sur les effets cytotoxiques induits par les nanoparticules, Monteiro Riviere *et al.* (2009) ont utilisé neuf méthodes différentes d'évaluation dans le but de déterminer le test le plus adapté. Cette étude utilise quatre nanomatériaux carbonés : noir de carbone (CB)², nanotubes de carbone monofeuillets (SWCNT)³, fullerènes (C60)⁴, fullerènes sous forme colloïdale en suspension aqueuse (nC60)⁵ et une nanoparticule non carbonée (quantum dots-QD). Les différents tests ont été réalisés sur une lignée humaine de kératinocytes HEK (human epidermal keratinocyte). Dans le but d'établir une classification des différents tests, les auteurs ont au préalable défini comme faux-positif toute modification du signal de toxicité (augmentation ou réduction) sans qu'aucune atteinte cellulaire ne soit observée. Deux points de contrôle sont effectués au cours de chaque test pour mettre en évidence les interactions entre nanoparticules et réactifs. Un premier est réalisé sans cellule pour s'assurer

que la présence des nanomatériaux aux concentrations choisies lors des différents tests ne perturbe pas, à elle seule, le signal. Pour ce faire, des plaques de 96 puits sont préalablement enduites de collagène, substance qui favorise l'adhésion des nanoparticules sur le fond des puits. Un deuxième point de contrôle, réalisé en présence de cellules, permet de déterminer dans quelle mesure les nanoparticules sont capables de modifier les résultats après réaction du colorant au niveau des cellules vivantes. Pour l'ensemble des tests, les auteurs précisent que les nanomatériaux carbonés sont fortement liés à la membrane cellulaire et ne peuvent pas être retirés par aspiration. Conformément aux études publiées antérieurement, le MTT ou le rouge neutre ont conduit à des faux-positifs lors de l'évaluation de la cytotoxicité utilisant les nanomatériaux carbonés, mais ont donné en revanche des résultats fiables avec les quantum dots. Dans le contrôle sans cellule, une augmentation de l'absorbance a été observée en corrélation avec la concentration en nanomatériaux carbonés. Ces phénomènes d'interférences ne seraient pas liés à une perturbation de la réaction enzymatique, mais plutôt à la nature insoluble du MTT-formazan : les nanomatériaux se lient aux cristaux de formazan et stabilisent leur structure chimique, empêchant ainsi l'étape de solubilisation. Au cours de l'étude, la méthode utilisant le bleu trypan a volontairement été abandonnée. En effet, la présence d'agglomérats recouvrant les cellules rend la visualisation et le dénombrement des cellules difficiles. De même, suite aux interactions physiques avec des agglomérats de noir de carbone ou de SWCNT, les auteurs ont également exclu les tests fluorescents calcein AM⁶ et Live/Dead[®] fondés sur une coloration des cellules vivantes et/ou mortes. De plus, pour ces deux tests, l'optimisation des concentrations en réactifs (calcein AM et EthD-1⁷) est fastidieuse et varie d'une lignée cellulaire à une autre. La calcein AM et EthD-1 ont également été utilisées pour la cytométrie de flux⁸ comme marqueurs respectifs des cellules vivantes (fluorescence verte) ou des cellules mortes (fluorescence rouge). Les auteurs considèrent que la mortalité des cellules exposées aux différents nanomatériaux est sous-estimée par un biais méthodologique lié à une perte de cellules mortes. De plus, les quantum dots interfèrent avec l'émission de fluorescence. D'après les auteurs, cette

technique de cytométrie de flux n'est donc pas à préconiser. Une autre méthode possible est le CytoTox-ONE® Homogeneous Membrane Integrity Assay. Elle permet d'évaluer par fluorimétrie le nombre de cellules mortes. La mortalité cellulaire est souvent associée à une perte d'intégrité membranaire et se détermine par l'évaluation dans le milieu de la quantité de certains composés normalement présents dans le cytoplasme. Le CytoTox-ONE® mesure la conversion de résazurine en résorufine, conséquence du relargage de la lactate déhydrogénase des cellules dotées d'une atteinte membranaire. Cette activité enzymatique étant influencée par la température, les réactifs et les cellules sont préalablement laissés à température ambiante. Ce test donne des résultats très variables avec d'importants écart-types, même avec les quantum dots. D'après les auteurs, ce test serait le moins fiable. CellTiter-Blue® et alamar Blue® essais sont deux méthodes similaires évaluant la réduction de la résazurine en résorufine fluorescente. Le contrôle sans cellule révèle une diminution de la fluorescence dose-dépendante avec le noir de carbone et SWCNT via une oxydation. Par contre, aucun faux-positif n'est observable après exposition au quantum dots ou aux différents fullérènes. Une autre méthode est le Celltiter 96® AQueous One⁹. Ce test est similaire au test MTT, mais aucune interférence dans le contrôle sans cellule n'a été mise en évidence. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation dans le Celltiter 96 AQueous One d'un sel de tétrazolium, le MTS¹⁰, qui donne du formazan soluble dans le milieu, contrairement au MTT. L'étape d'extraction à l'origine de la remise en suspension des nanoparticules n'est donc plus nécessaire. D'autres tests de sels de tétrazolium conduisent à la formation de formazan soluble. C'est le cas du test WST11 qui a déjà été décrit comme fiable. En conclusion, les auteurs désignent le Celltiter 96® AQueous One comme la méthode la plus efficace, mais suggèrent néanmoins de confirmer les résultats obtenus par un deuxième test de son choix.

Commentaire

Les nanomatériaux, et surtout certains nanomatériaux carbonés, interfèrent avec différents marqueurs de cytotoxicité employés dans les tests classiques, induisant ainsi des variations importantes dans les résultats obtenus. Les nanomatériaux solubles donnent des suspensions stables comme nC60 et les quantum dots induisent eux des interférences mineures par rapport aux nanomatériaux moins solubles (CB, SWCNT, C60). Le choix de la méthodologie ne doit plus résider uniquement sur les paramètres cytotoxiques choisis (atteinte métabolique, atteinte membranaire...), mais doit surtout tenir compte des propriétés physico-chimiques du nanomatériau lui-même et de ses interactions potentielles avec les réactifs.

Nouvelle méthodologie en nanotoxicologie: la bioluminescence

Pour l'évaluation de la viabilité cellulaire, **Wahl et al. (2008)** proposent d'utiliser une nouvelle méthode de bioluminescence rendant compte de l'activité métabolique cellulaire par détermination du niveau intracellulaire en adénosine triphosphate (ATP)¹². L'enzyme luciférase catalyse une réaction conduisant à la formation de lumière à partir d'ATP et de luciférine. Ainsi, la mesure de l'intensité lumineuse émise par un luminomètre¹³ permet de déterminer la concentration en ATP et indique le nombre de cellules vivantes. Deux kits différents, Vialight PLUS et Vialight HS, ont été employés au cours de cette étude sur des nanoparticules d'oxyde de silice (15 nm) et sur des Fluospheres® (20 nm et 200 nm). Les auteurs signalent l'avantage de ces tests en termes de rapidité et simplicité de réalisation. Après l'étape d'incubation avec les composés testés, 20 minutes sont nécessaires pour obtenir un résultat. Pour éviter toute interférence liée à une insolubilité lors de la mesure de luminescence, les nanoparticules sont préalablement séparées du dispersat (milieu de remise en suspension) par centrifugation avec des tubes Centrisart®. Lors de la mesure de luminescence, le surnageant récolté est utilisé en tant que témoin négatif comme demandé dans les instructions du fabricant. De plus, pour identifier toute modification parasite du signal luminescent causée par les propriétés des nanoparticules, un signal artificiel est généré par addition de 4 concentrations définies en ATP. Après ajout de nanomatériaux, le signal de luminescence obtenu est comparé au signal artificiel généré par l'ATP seul. Une diminution du signal est associée à un phénomène d'interférence des nanomatériaux. L'étude a été réalisée sur la lignée CaCo-2 possédant toutes les caractéristiques typiques de la barrière intestinale humaine. La comparaison des deux kits a montré que le kit Vialight PLUS offre un signal plus stable de luminescence pour une période de 90 min et une plus grande précision. En parallèle et pour comparaison, un test LDH¹⁴ évaluant la quantité de LDH relarguée lors de l'altération de l'intégrité membranaire a été effectué. Concernant les nanoparticules de silice, les résultats obtenus avec les tests de bioluminescence se sont avérés plus fiables que ceux avec le test LDH. Une mauvaise dispersion des nanoparticules dans le milieu n'altère en rien le signal luminescent, ce qui signifie que le test Vialight PLUS peut être également utilisé pour étudier certaines nanoparticules, qui peuvent interférer avec les réactifs par des phénomènes de précipitation, comme les nanoparticules de dioxyde de silice. Néanmoins, un phénomène de Quenching de la luminescence¹⁵ a été observé avec les Fluospheres® pour les concentrations élevées de 1 mg/mL et 10 mg/mL avec perte du signal d'environ 50 % et 70 % respectivement, rendant l'utilisation du test Vialight inappropriée.

Commentaire

Des deux tests Vialight PLUS et Vialight HS, le kit Vialight PLUS offre une meilleure acquisition du signal lumineux et semble plus reproductible. Ce test permet également d'obtenir des résultats satisfaisants avec des nanomatériaux pouvant interférer par des phénomènes de précipitation. Par contre, ce type de méthode ne semble pas être applicable à des particules fluorescentes, la lumière émise interagissant avec la fluorescence. Il pourrait être intéressant d'étudier la fiabilité de ce test avec des nanomatériaux possédant des propriétés optiques comme les quantum dots et de s'assurer d'une non-distorsion du signal lumineux.

Méthodes utilisables lors de l'évaluation de la cytotoxicité des nanomatériaux

Dans leur article, Marquis et al. (2009) rapportent les techniques couramment utilisées en nanotoxicologie. Elles sont répertoriées en trois catégories: la prolifération, la nécrose et l'apoptose. Dans la catégorie « prolifération », deux méthodes non citées précédemment nous semblent intéressantes: l'incorporation de la thymidine tritiée et le test clonogénique. Les auteurs décrivent l'incorporation de la thymidine tritiée, représentative de la quantité d'ADN synthétisée, comme une méthode hautement sensible de la prolifération cellulaire, mais souvent écartée pour des raisons de coût. D'après les auteurs, l'utilisation du test clonogénique pourrait être une alternative pour éviter les interactions entre les nanomatériaux et les molécules indicatrices de toxicité (colorant, molécules fluorescentes). Ce test est fondé sur la capacité des cellules à former des colonies et présente l'avantage de ne pas être un test de survie globale d'une population polyclonale, contrairement au MTT ou WST. Comme le décrivent Herzog *et al.* (2007), les cellules sontensemencées à très faible densité après exposition aux différents nanomatériaux (SWCNT synthétisé par high pressure CO conversion, SWCNT synthétisé par la méthode de décharge d'arc, noir de carbone). Les colonies obtenues après 10 jours de culture sont visualisées par coloration et comptées grâce à l'utilisation d'un logiciel d'analyse d'images. La capacité à former des colonies est exprimée en pourcentage relativement au nombre de colonies formées pour les cellules non exposées. Toute perte de capacité est représentative d'un effet toxique des nanomatériaux (Casey *et al.*, 2008).

Commentaire

L'utilisation du test clonogénique paraît intéressante car *a priori* réalisable quelles que soient les caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux. Étant donné que cette méthode ne nécessite aucun indicateur coloré ou fluorescent, elle permet une évaluation non faussée de la toxicité. D'après Casey *et al.* (2008), la mesure de la surface

des colonies apporterait une information complémentaire en termes de ralentissement de la multiplication cellulaire. Ce test a été d'ailleurs utilisé par Horie et al. (2009) au cours d'une étude sur l'absorption de protéines du milieu de culture par des nanoparticules d'oxyde de métal (NiO¹⁶, ZnO¹⁷, TiO₂¹⁸, CeO₂¹⁹, SiO₂²⁰ et Fe₂O₃²¹). Cette étude visait à identifier les répercussions sur la cytotoxicité.

Conclusion générale

Le Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) informe de l'absence de validation des méthodes *in vitro* permettant d'évaluer spécifiquement les effets potentiels pour l'homme des nanomatériaux et insiste sur le fait que l'accumulation des nanoparticules est un facteur crucial à prendre en considération pour évaluer le risque toxique encouru.

Au niveau méthodologique, le type et la nature des nanomatériaux constituent un point critique dans la fiabilité des tests de cytotoxicité. Il faut donc impérativement tenir compte de leurs propriétés physico-chimiques (taille, forme, densité, pouvoir absorbant, fluorescence), ainsi que de leur comportement dans le milieu de culture (agglomérat, décantation, absorption des micronutriments) afin de choisir au mieux le test de cytotoxicité. Après analyse des articles, les tests clonogéniques ou la méthode de bioluminescence Vialight PLUS, ainsi que les tests de cytotoxicité utilisant le WST (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium) ou le MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium) semblent pouvoir être utilisés avec différents types de nanomatériaux. Néanmoins, le développement de nouvelles méthodes non fondées sur l'utilisation d'indicateurs colorés ou fluorescents reste essentiel pour faciliter les études toxicologiques. Dans ce cadre, des techniques prometteuses comme la mesure d'impédance par Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) pourront être adaptées avec monitoring (acquisition et suivi) des phénomènes cellulaires survenant tout au long de l'exposition à une substance toxique, de l'étape d'attachement jusqu'à la mort cellulaire (adhérence, phénomènes de motilité cellulaire, etc.).

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Cytotoxicity, Method, Nanomaterial, Nanoparticle, Risk, Toxicity.

Publications analysées

Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 234 (2): 222-35.

Wahl B, Daum N, Ohrem HL et al. Novel luminescence assay offers new possibilities for the risk assessment of silica nanoparticles. *Nanotoxicol.* 2008; 2 (4): 243-51.

Marquis BJ, Love SA, Braun KL et al. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst.* 2009; 134 (3): 425-39.

Publications de référence

Casey A, Herzog E, Lyng FM et al. Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. *Toxicol. Lett.* 2008; 179 (2): 78-84.

Herzog E, Casey A, Lyng FM et al. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials--the clonogenic assay. *Toxicol. Lett.* 2007; 174 (1-3): 49-60.

Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano. Lett.* 2006; 6 (6): 1261-8.

Wörle-Knirsch JM, Kern K, Schleh C et al. Nanoparticulate vanadium oxide potentiated vanadium toxicity in human lung cells. *Environ. Sci. Technol.* 2007; 41 (1): 331-6.

Revue de la littérature

Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* 2008; 4 (1): 26-49.

Shvedova AA, Kisin ER, Porter D et al. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? *Pharmacol. Ther.* 2009; 121 (2): 192-204.

Publications non sélectionnées

AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 2009; 3 (2): 279-90.

Description du test cell-Titer glow luminescent cell viability assay, proche du Vialight déjà analysé dans la NAS.

Auffan M, Rose J, Wiesner MR et al. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity *in vitro*. *Environ. Pollut.* 2009; 157 (4): 1127-33.

Revue généraliste citant peu de méthodes d'évaluation de la toxicité cellulaire.

Herzog E, Byrne HJ, Casey A et al. SWCNT suppress inflammatory mediator responses in human lung epithelium *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 234 (3): 378-90.

Article utilisant un seul test de cytotoxicité le CellTiterBlue® déjà analysé dans la NAS.

Horie M, Nishio K, Fujita K et al. Protein Adsorption of Ultrafine Metal Oxide and Its Influence on Cytotoxicity toward Cultured Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 2009; sous presse.

Aucune comparaison entre les résultats obtenus avec le test MTT et ceux du test clonogénique.

Hu X, Cook S, Wang P et al. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 2009; 407 (8): 3070-2.

Description d'une nouvelle méthode d'évaluation de la cytotoxicité mais sur bactérie E. Coli.

Kroll A, Pillukat MH, Hahn D et al. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 72 (2): 370-7.

Article rapportant uniquement les méthodes in vitro couramment utilisées.

Lee J, Lilly GD, Doty RC et al. *In vitro* toxicity testing of nanoparticles in 3D Cell Culture. *Small.* 2009; 5 (10): 1213-21.

Article décrivant l'intérêt de l'utilisation d'un modèle cellulaire 3D par rapport à du 2D.

Tarantola M, Schneider D, Sunnick E et al. Cytotoxicity of metal and semiconductor nanoparticles indicated by cellular micromotility. *ACS Nano.* 2009; 3 (1): 213-22.

Méthode très innovante mais nécessitant un système efficace d'acquisition des données.

Yang H, Liu C, Yang D et al. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.* 2009; 29 (1): 69-78.

Article décrivant des tests classiquement utilisés (MTT, WST).

Lexique

- ¹ MTT: Bromure de 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
- ² CB: Carbon Black ou noir de carbone
- ³ SWCNT: Nanotubes de carbone monofeuillets
- ⁴ C60: Fullerènes
- ⁵ nC60: Fullerènes sous forme colloïdale en suspension aqueuse

- ⁶ Calcein AM: Calcein acetoxymethylester, composé non-fluorescent hydrolyse par les estérases intracellulaires en composé fluorescent
- ⁷ EthD-1: Ethidium homodimer-1 composé pénétrant dans les cellules endommagées et fluorescent quand il se lie aux acides nucléiques
- ⁸ Cytométrie de flux: Technique faisant défiler des cellules à grande vitesse dans un faisceau laser et dont l'analyse de la lumière réémise par diffusion ou fluorescence permet de trier les cellules en fonction du critère sélectionné (pour exemple: viabilité et mortalité)
- ⁹ Celltiter 96 AQ^{one}: Celltiter 96® AQueous One
- ¹⁰ MTS: 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5- (3-carboxymethoxyphenyl)-2- (4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
- ¹¹ WST: 2- (4-iodophenyl)- 3- (4-nitrophenyl)-5- (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
- ¹² ATP: Adénosine triphosphate, nucléotide fournissant l'énergie nécessaire à la cellule
- ¹³ Luminomètre: Appareil servant à mesurer l'intensité lumineuse
- ¹⁴ LDH: Lactate deshydrogenase, enzyme permettant la conversion réversible du pyruvate en lactate
- ¹⁵ Quenching de la luminescence: processus de diminution de l'intensité lumineuse pouvant être lié à divers phénomènes (transfert d'énergie, réactions d'excitations, piégage...),
- ¹⁶ NiO: Monoxyde de nickel
- ¹⁷ ZnO: Monoxyde de zinc
- ¹⁸ TiO₂: Dioxyde de titane
- ¹⁹ CeO₂: Dioxyde de cérium
- ²⁰ SiO₂: Dioxyde de silice
- ²¹ Fe₂O₃: Trioxyde de fer