

Nanoparticules produites intentionnellement : dangers et risques sanitaires (données épidémiologiques et expérimentales)

Effets toxiques des nanoparticules TiO₂ et des nanotubes de carbone chez la souris

Période : avril 2009 à août 2009

Mary-Line JUGAN et Marie CARRIÈRE

CEA de Saclay – Laboratoire Pierre Süe, groupe de toxicologie humaine et environnementale – Gif-sur-Yvette

Mots clés : Distribution des nanoparticules, Dioxyde de titane, Immunotoxicité, Nanotubes de carbone, Souris

Les effets d'une exposition aux nanoparticules (NP) suscitent un grand intérêt, du fait des nombreuses applications commerciales dans lesquelles elles sont utilisées. Les conclusions des études toxicologiques réalisées *in vivo* sont souvent divergentes, dans la mesure où les effets dépendent fortement de la voie d'exposition et des caractéristiques physicochimiques des NP. Les effets les plus fréquemment évoqués dans la littérature concernent l'inflammation, l'apparition de fibroses et la suppression des fonctions immunitaires au niveau des poumons, en lien avec une exposition aux nanotubes de carbone, notamment après une instillation intratrachéale (Stern et McNeil, 2008). Les mécanismes d'action impliqués dans les effets toxiques des NP sont aujourd'hui mal connus et peu documentés. La première publication sélectionnée élucide l'un des mécanismes d'action impliqués dans la toxicité de nanotubes de carbone multifeuillets chez la souris par inhalation (Mitchell *et al.*, 2009). Un autre aspect peu investigué dans les études toxicologiques *in vivo* réside en l'accumulation des NP dans les tissus des organismes exposés. La seconde étude apporte des données sur l'accumulation de NP de TiO₂ dans les organes de souris après administration par voie intrapéritonéale.

Mécanisme d'action impliqué dans l'effet immunosuppresseur des nanotubes de carbone chez la souris

Analyse

L'équipe de Mitchell *et al.* (2009) a récemment publié une étude *in vivo* sur les conséquences d'une exposition par inhalation de nanotubes de carbone multifeuillets (MWNT, pour multi-walled nanotubes). L'aspect mécanistique de la perturbation du système immunitaire y est exploré. Des souris mâles adultes ont été exposées 6 heures par jour pendant 14 jours à une atmosphère contenant de 0,3 à 1 mg/m³ de MWNT, dont la taille moyenne est de 94,5 nm. La quantité de MWNT déposée dans les poumons est estimée respectivement à 0,15 mg/kg et 0,5 mg/kg (estimation en fonction de la surface pulmonaire et de la capacité respiratoire des souris). En premier lieu, l'étude des lymphocytes T, cellules fortement impliquées dans la réponse immunitaire, a confirmé qu'une exposition des souris à 1 mg/m³ de MWNT engendre une diminution de la réponse immunitaire. En effet, les nanotubes de carbone inhalés provoquent une diminution de la prolifération des lymphocytes T en réponse aux mitogènes⁽¹⁾, cette diminution étant dépendante de la dose de MWNT. Cet effet persiste plus de 30 jours après l'inhalation.

L'équipe a ensuite exploré les mécanismes potentiellement impliqués dans la suppression de la réponse immunitaire, et notamment la voie des cyclooxygénases⁽²⁾ de type 2 (COX-2), enzymes clés du contrôle des processus inflammatoires. Il apparaît que l'expression des cyclooxygénases est accrue dans la

rate des souris exposées à 1 mg/m³ de MWNT, comparativement aux souris témoins, exposées dans les mêmes conditions à de l'air ne contenant pas de MWNT. De plus, l'expérience a été réalisée après traitement de certains animaux par l'ibuprofène, un inhibiteur pharmacologique de COX-2. Ce blocage de la transmission du signal provoque une disparition partielle des effets immunosuppresseurs des MWNT. Enfin, la même expérience a été menée sur des souris mutantes, déficientes pour le gène codant COX-2. Dans ce cas, l'effet de l'exposition aux MWNT disparaît chez les souris mutantes exposées à 1 mg/m³ de MWNT pendant 14 jours. Ces résultats démontrent l'implication de COX-2 dans les effets des MWNT.

Les auteurs ont également réalisé des études histologiques sur la rate des souris exposées et pointent l'absence de MWNT dans celle-ci, suggérant un effet indirect des MWNT. Pour étudier celui-ci, du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) a été prélevé chez les souris exposées ou non aux MWNT et mis en contact avec des cultures de splénocytes⁽³⁾, extraites de la rate des souris mutantes n'exprimant pas le gène COX-2, ou de la rate de souris sauvages. Alors que le LLBA des souris non exposées n'a aucun effet sur les cellules de rates, celui des animaux exposés aux MWNT induit une inhibition de la prolifération des lymphocytes T dans des splénocytes isolées des souris de phénotype sauvage. Cet effet n'est pas observé chez les souris mutantes n'exprimant pas COX-2. Un mécanisme pulmonaire est donc suggéré comme étant à l'origine de l'activation des cyclooxygénases dans la rate, phénomène qui mène à un dysfonctionnement des lymphocytes T.

Commentaire

L'étude de **Mitchell et al. (2009)** a permis de démontrer l'effet immunosuppresseur des MWNT. D'autre part, l'altération de l'immunité consécutive à l'exposition par inhalation de nanotubes de carbone multifeuillets était initiée par un signal pulmonaire. L'utilisation de modèles de souris mutantes n'exprimant pas la cyclooxygénase 2 et l'association de techniques *in vitro* utilisant les cellules extraites de souris est une approche originale qui a permis une démonstration stricte de l'effet des MWNT. Cette étude fournit de précieuses informations sur les conséquences probables sur la santé d'une exposition répétée aux nanotubes de carbone, même si les conséquences à long terme d'un effet dépresseur sur les lymphocytes T sont aujourd'hui mal connues. En revanche les auteurs ne précisent pas l'état d'agglomération des nanotubes après exposition des animaux. Une étude fine de leur état d'agglomération et de leur distribution pulmonaire serait nécessaire.

Distribution et effets histopathologiques du dioxyde de titane TiO₂ chez les souris après administration intrapéritonéale

Analyse

Chen et al. (2009) ont réalisé une étude des effets aigus liés à l'exposition de souris aux nanoparticules de titane (TiO₂). Les auteurs se sont particulièrement intéressés à la distribution des nanoparticules et aux altérations histopathologiques qui découlent de l'exposition. Les souris ont subi une injection intrapéritonéale avec différentes doses de TiO₂ (0, 324, 648, 972, 1296, 1944, 2592 mg/kg). Les effets de ces injections ont été évalués 2 heures, 48 heures, 7 jours et 14 jours après injection. Deux jours après l'injection, toutes les souris présentent des symptômes relatifs à une toxicité aiguë, tels que des tremblements, la perte d'appétit et la léthargie. Ces effets semblent moins prononcés chez les souris exposées aux plus faibles doses ; celles exposées aux deux doses les plus fortes présentent également des symptômes d'anorexie et de diarrhée. Les tissus de rate, cœur, poumon, rein et foie ont été collectés à différents temps après l'exposition ; le titane a été dosé dans ces organes par spectroscopie de masse couplée à une torche à plasma (ICP-MS). Du titane a été détecté dans le foie, les reins et les poumons, avec une accumulation particulièrement élevée dans la rate. Après 24 heures d'exposition, le titane est accumulé en majorité dans la rate, et sa concentration diminue après 48 heures, au profit du foie, des reins et des poumons. 7 jours et 14 jours après exposition, la rate est l'organe qui contient le plus de titane, à des concentrations équivalentes à celles mesurées après 48 heures d'exposition. Chez les animaux les plus exposés, les concentrations de titane dans la rate sont de l'ordre du microgramme de titane par gramme de tissu. Enfin, aucune accumulation n'est observée dans le cœur.

Les analyses histopathologiques ont par ailleurs retenu des fibroses hépatiques, des lésions sévères de la rate et des thromboses du système vasculaire pulmonaire. De nombreux neutrophiles⁽⁴⁾ sont présents dans la rate, le foie, et les poumons,

suggérant une réaction inflammatoire importante. Ces effets sont observés chez les animaux les plus exposés (1944 et 2592 mg/kg) et sont faibles ou inexistantes pour les plus faibles doses. Il est à noter qu'aux deux doses les plus élevées, correspondant à deux groupes de 10 souris, cinq souris sont mortes une semaine après l'exposition. Les paramètres biochimiques sanguins ont également été mesurés, incluant l'urée sanguine, les transaminases (aspartate et alanine aminotransférases : ASAT et ALAT) et la phosphatase alcaline. Le suivi de ces paramètres a mis en évidence des niveaux élevés d'ASAT et d'ALAT, témoignant d'un dysfonctionnement hépatique. L'urée sanguine, utilisée comme marqueur du bon fonctionnement rénal, n'est pas significativement modifiée par la présence de NP. L'étude de **Chen et al. (2009)** démontre donc qu'une partie des NP de TiO₂ injectées par voie intrapéritonéale chez les souris est excrétée par le rein et que la néphrotoxicité exercée par ces NP est moindre par rapport à la toxicité exercée sur le foie.

Commentaire

Chen et al. (2009) ont mis en évidence qu'à la suite d'une injection péritonéale chez des souris, les nanoparticules de TiO₂ sont accumulées dans plusieurs organes, incluant la rate, le foie, les poumons et le rein. Des altérations des paramètres biochimiques et de l'état des organes sont observées pour les doses d'exposition les plus élevées. Les auteurs ont réalisé une caractérisation rigoureuse de la taille et de la forme cristalline des nanoparticules de TiO₂ au moment de l'injection, deux caractéristiques connues pour exercer une influence la fois la distribution et la toxicité des NP (Warheit et al., 2008, cf. *Bulletin de veille scientifique* n° 10, juin 2010). En revanche, une caractérisation précise de l'état d'agglomération des nanoparticules dans les différents organes manque à cette étude. La quantité de titane dans les différents organes est ensuite dosée par ICP-MS, technique qui ne permet pas d'affirmer que le titane dosé provient des nanoparticules de TiO₂ ou du titane dissout à partir de ces nanoparticules. Les auteurs ont donc choisi d'y associer une analyse par microscopie, réalisée sur des coupes d'organes, approche qui permet de valider la présence des nanoparticules dans les organes. Cette association du suivi des paramètres biochimiques, avec des observations microscopiques et appuyée par des mesures des concentrations de TiO₂ fait toute l'originalité de cette étude, qui fournit une démonstration des effets néfastes liés à une exposition à ces nanoparticules. La voie d'exposition étudiée (injection intrapéritonéale) n'est néanmoins pas représentative des conditions réelles d'exposition.

Effets toxiques des nanoparticules TiO₂ et des nanotubes de carbone chez la souris

Mary-Line JUGAN et Marie CARRIÈRE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les deux études décrites utilisent différentes voies d'exposition des souris aux nanoparticules : l'inhalation et l'injection péritonéale. L'utilisation d'une technologie d'aérosol dans l'étude de **Mitchell et al. (2009)** est particulièrement intéressante, car celle-ci est représentative d'une exposition pulmonaire. Même s'il existe trois voies d'exposition potentielle aux nanotubes de carbone incluant l'inhalation, l'ingestion et le contact cutané, l'appareil respiratoire constitue la voie majeure de pénétration dans l'organisme humain. La méthode d'exposition par inhalation est donc pertinente par rapport à une exposition dans des conditions « réelles ». Les expositions par inhalation, si elles sont associées à une caractérisation physico-chimique rigoureuse des nanoparticules, constituent assurément la technique de choix pour l'étude des effets pulmonaires des nanoparticules. En revanche, l'injection dans le péritoine utilisée dans l'étude de **Chen et al. (2009)** est moins représentative et il est probable que la distribution tissulaire des NP pourrait être différente chez la souris exposée par inhalation, par voie orale ou par contact cutané. Il apparaît important de prendre en compte les applications des NP testées pour utiliser une méthode d'exposition pertinente.

Même si l'immunotoxicité des nanotubes de carbone et l'un des mécanismes mis en jeu ont été démontrés sur les souris, des questions majeures restent en suspens. Les résultats, aussi bien ceux concernant la distribution tissulaire que les effets mis en évidence et les mécanismes inhérents, sont-ils applicables à tous les types de nanotubes de carbone et de nanoparticules de TiO₂ ? La question de l'extrapolation à l'Homme se pose également et les investigations mécanistiques paraissent être un bon moyen de mettre en évidence des marqueurs de la nanotoxicité potentiellement exploitables chez l'Homme. Enfin, il existe aujourd'hui peu d'information sur les doses réelles d'exposition de l'Homme aux nanoparticules et la question de la représentativité des doses par rapport à une exposition professionnelle reste sans réponse.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Carbon nanotubes, Distribution, Immunotoxicity, Metallic oxides, Nanotoxicity.

Publications analysées

Chen J, Dong X, Zhao J et al. *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J. Appl. Toxicol.* 2009 ; 29(4):330-7.

Mitchell LA, Lauer FT, Burchiel SW et al. Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. *Nat. Nanotechnol.* 2009 ; 4(7):451-6.

Publications de référence

Stern ST et McNeil SE. Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol. Sci.* 2008 ; 101(1):4-21.

Warheit DB, Sayes CM, Reed KL et al. Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol. Ther.* 2008 ; 120(1):35-42.

Publications non sélectionnées

Liu H, Ma L, Zhao J et al. Biochemical toxicity of nano-anatase TiO₂ particles in mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 2009;129(1-3):170-80. *Cet article n'a pas été sélectionné, même s'il affiche en partie les mêmes objectifs que l'article de Chen et al., 2009, à savoir l'effet des TiO₂ sur les organes de souris. Les techniques utilisées pour démontrer la toxicité des TiO₂ sont en effet restreintes à l'étude des paramètres biochimiques des animaux, alors que Chen et al., 2009 utilisent un panel de techniques complémentaires qui illustrent mieux l'effet lié à une exposition aux nanoparticules.*

Koeneman BA, Zhang Y, Hristovski K et al. Experimental approach for an *in vitro* toxicity assay with non-aggregated quantum dots. *Toxicol. In Vitro.* 2009 ; 23(5):955-62.

Cette étude a été réalisée in vitro et ne correspond pas à la thématique de notre article, focalisé sur les résultats obtenus in vivo.

Park EJ, Yoon J, Choi K et al. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology.* 2009 ; 260(1-3):37-46.

Rahman MF, Wang J, Patterson TA et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 2009 ; 187(1):15-21.

Les deux publications ci-dessous utilisent des approches transcriptomiques pour étudier la toxicité de nanomatériaux. Nous avons préféré centrer la présente note sur des approches toxicologiques plus classiques. La toxicogénomique est en effet une discipline émergente de la nanotoxicologie. Il s'agit d'une thématique qui mériterait une note d'actualité dédiée.

Lexique

- (1) Mitogènes : substances favorisant la division cellulaire.
- (2) Cyclooxygénases : enzymes clés impliquées dans le processus inflammatoire.
- (3) Splénocytes : cellules de la rate.
- (4) Neutrophiles : cellules sanguines qui jouent un rôle primordial dans l'élimination des cellules étrangères ou infectées.