

La nanométrie pour l'évaluation des risques liés aux nanoparticules

Période : septembre 2009 à décembre 2009

Jean-Luc BOUDENNE et Bruno COULOMB

Université de Provence/CNRS – Laboratoire Chimie Provence, UMR6264, Chimie de l'environnement continental – Marseille

Mots clés : Dioxyde de titane, Fullerènes, Métrologie, Nanoparticules, Tests de toxicité

Les nanoparticules⁽¹⁾ retrouvées dans l'environnement sont en général classifiées, dans un premier temps, par leur source (Farré *et al.*, 2009) : anthropogénique, anthropique non intentionnelle, anthropique intentionnelle (industries de la nanotechnologie).

Les nanoparticules d'origine naturelle sont présentes dans les couches géologiques de la Terre (silice amorphe, certains aluminosilicates, certaines argiles comme l'halloysite⁽²⁾, certains oxydes comme l'hématite⁽³⁾ et la magnétite⁽⁴⁾), dans l'atmosphère (fullerènes⁽⁵⁾, aérosols résultant de l'oxydation du dioxyde de soufre (SO₂) et de divers composés organiques) et dans les milieux aquatiques (complexes polynucléaires et nanoclusters⁽⁶⁾ d'aluminium (Al₁₃ et Al₃₀) et de sulfures (Cu₄S₆). Les phénomènes naturels d'érosion, de combustion, de lixiviation, mais également divers processus microbiologiques, peuvent amener ces nanoparticules à migrer entre les différents compartiments de l'environnement.

Les nanoparticules d'origine anthropique, non intentionnelle, résultent de la combustion d'énergies fossiles ou de l'exploitation minière, tandis que les nanoparticules émises dans l'environnement de façon « intentionnelle » résultent des industries nanotechnologiques : nanoparticules de titane (peintures, cosmétiques), nanoparticules de silice (lubrifiants), nanoparticules à base de protéines (savons, détergents), nanoparticules métalliques (réhabilitation des eaux et des sols), nanoparticules de tout genre (industries électroniques et pharmaceutiques (Woodrow Wilson Institute, 2010).

Cette production et cette utilisation croissante de nanomatériaux conduisent inévitablement à leur accumulation dans l'environnement, et sont susceptibles de générer des effets majeurs sur la santé humaine (Crosera *et al.*, 2009 ; Elder *et al.*, 2009) et sur l'environnement. Afin d'évaluer les risques liés à l'exposition à ces composés, de nombreux auteurs ont proposé des méthodes pour classifier les nanomatériaux en fonction de leurs risques associés : approche mono-critère basée sur le comportement des nanomatériaux dans l'environnement (Lowry et Casman, 2009), approche multi-critères -MCDA⁽⁷⁾- (Linkov *et al.*, 2009), approche du « Control-Banding⁽⁸⁾ » (Zalk *et al.*, 2009).

Quelle que soit la méthode d'évaluation des risques utilisée, il est nécessaire de connaître la dose d'exposition, ce qui implique de pouvoir quantifier les nanoparticules dans l'environnement, en fonction des sources émettrices. La nanométrie (Simonet et Valcarcel, 2009) est la science qui rassemble toutes les techniques analytiques qui peuvent être utilisées pour quantifier les niveaux de contamination des milieux, étape nécessaire à l'estimation de doses d'exposition. Cette note d'actualité scientifique se focalise sur deux articles portant sur les méthodes de mesures de nanoparticules dans l'eau, et sur un troisième portant sur la toxicité de ces nanoparticules dans les milieux aquatiques.

Détermination fiable de la taille des nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière afin d'évaluer leur toxicité *in vitro*

Analyse

Le comportement des nanoparticules dans l'environnement et leurs propriétés physico-chimiques spécifiques ne facilitent pas l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux. Ainsi, les critères de solubilité⁽⁹⁾ ou de coefficient de partage octanol/eau⁽¹⁰⁾ classiquement utiles pour décrire le devenir des composés chimiques traditionnels, ne permettent pas de traduire le devenir des nanoparticules (Lowry et Casman, 2009). C'est pourquoi, il est communément admis que la toxicité des nanoparticules est directement liée, en premier lieu, à leur morphologie, c'est-à-dire à leur taille et à leur forme (Simonet et

Valcarcel, 2009). Les techniques reconnues jusqu'à aujourd'hui combinent des outils de comptage (nombre de particules reliées à la courbe de distribution de tailles de particules) et de caractérisation (composition chimique des particules). On peut citer la spectrométrie à mobilité électrique (FMPS⁽¹¹⁾), combinée à un compteur de noyaux de condensation assurant la détection de particules entre 5 et 600 nm et la Microscopie Electronique à Balayage (MEB⁽¹²⁾) pour l'étude de la morphologie, couplée à une analyse dispersive en énergie (EDS⁽¹³⁾) pour l'étude de l'analyse élémentaire (Campbell, 2009). Toutefois, si ces techniques semblent efficaces pour déterminer la taille des particules dans l'air ou sur support solide et faire l'objet d'un consensus dans les publications scientifiques, celles utilisées lors des tests de toxicité menés en solution, *in vitro*, ne sont pas encore standardisées et aboutissent, de ce fait, à des résultats contradictoires quant à la toxicité des nanoparticules étudiées (Murdock *et al.*, 2008).

À cette absence de technique standardisée, s'ajoute également l'absence d'une harmonisation dans la préparation du milieu de culture et enfin, des définitions différentes pour le paramètre « diamètre hydrodynamique moyen » des nanoparticules, alors que c'est à partir de celui-ci que va être déterminée la toxicité relative des nanoparticules.

Dans la publication analysée (Kato *et al.*, 2009), les auteurs proposent un protocole optimisé pour la détermination des tailles de nanoparticules pour les évaluations de toxicité *in vitro*. La technique analytique utilisée est la mesure de la Diffusion Dynamique de Lumière (DDL⁽¹⁴⁾); elle est reconnue comme pouvant déterminer des particules de taille comprise entre 1 et 3 µm, et comme étant apte à déterminer *in situ* la taille des nanoparticules originelles (nanoparticules primaires) et des nanoparticules secondaires (résultant soit de l'agrégation des nanoparticules entre elles, soit des interactions entre les protéines du milieu de culture et ces nanoparticules). Ce sont les tailles de ces deux types de nanoparticules qui constituent les paramètres caractéristiques de la cytotoxicité *in vitro*.

Trois instruments types permettant la mesure de la DDL ont été testés (caractérisés par des puissances de laser, des longueurs d'onde de mesure, des sensibilités des détecteurs et des angles de mesure différents). Les résultats donnés par ces mesures (diamètre hydrodynamique moyen) ont été comparés aux mesures de taille de trois types de nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂). Des mesures de répétabilité ont permis de valider le protocole analytique.

Les propriétés intrinsèques des particules en suspension ont également été suivies au cours des tests de toxicité *in vitro* (d'une durée moyenne d'une semaine): sédimentation, agglomération, diffusion, qui sont des modes de transport qui influent directement sur la nanotoxicité.

Un milieu de culture type est également proposé pour réaliser ces tests (DMEM⁽¹⁵⁾ avec 10 % de sérum de veau fœtal inactivé, 100 unités/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 250 ng/mL d'amphotéricine B). À ce milieu de culture, il est fortement conseillé de ne pas ajouter de surfactant au milieu de culture comme c'est généralement pratiqué pour améliorer la dispersion des nanoparticules dans le milieu de culture. Pour les auteurs, cet ajout de surfactant biaise les résultats.

Commentaire

L'harmonisation des techniques utilisées pour déterminer la taille des nanoparticules durant les tests de toxicité *in vitro* est nécessaire, comme le montrent les résultats contradictoires obtenus par certains auteurs. Le mérite du protocole pratique présenté par les auteurs (Kato *et al.*, 2009) est d'orienter cette harmonisation. Le choix des caractéristiques analytiques de la DDL a été ici validé statistiquement et la distinction des différents modes de transport permet d'éviter les mauvaises interprétations quant à l'évaluation de la toxicité *in vitro*. Une validation du protocole proposé sur d'autres types de nanoparticules, ainsi que la prise en compte non seulement de la taille mais également de la forme des nanoparticules permettrait de compléter ce protocole.

Quantification de nanoparticules de fullerène en suspension dans l'eau basée sur la diffusion optique

Analyse

Les fullerènes sont des nanoparticules qui existent naturellement dans l'environnement, à l'origine, mais qui sont aujourd'hui synthétisées en quantités importantes pour des applications en science des matériaux en électronique ou en biomédecine.

Parmi ces fullerènes, le C₆₀ (buckyminsterfullerène) présente une stabilité chimique très importante, même en présence d'acides ou de bases, ce qui induit une biodégradation très faible dans l'environnement.

La plupart des méthodes analytiques de dosage de C₆₀ consiste en une étape d'extraction par solvant suivi d'une analyse directe par spectrophotométrie UV-Visible, ou précédée d'une séparation par chromatographie liquide haute performance ou chromatographie sur couche mince. Dans le domaine de l'UV-Visible, le C₆₀ présente des bandes d'absorption caractéristiques à 208, 252 et 380 nm dans l'hexane.

Dans leur étude (Sene *et al.*, 2009), les auteurs proposent une méthode analytique basée sur la néphélométrie, c'est-à-dire basée sur la mesure de la diffraction de la lumière. Le protocole développé consiste à mettre en suspension les nanoparticules de C₆₀ (diamètre 17 ± 2 nm) dans du toluène puis à évaporer partiellement le solvant durant 1 heure, avant d'ajouter de l'eau. La solution résultante est ensuite analysée dans un spectrofluorimètre, en faisant un balayage en longueur d'onde entre 220 et 900 nm, tout en mesurant la lumière diffractée à un angle de 90°.

La méthode développée permet de mesurer le C₆₀ dans une gamme 0,007-0,360 mg/L, avec une limite de détection de 0,0090 mg/L (± 0,0008) et une limite de quantification de 0,017 mg/L (± 0,004).

Commentaire

Les auteurs de cet article (Sene *et al.*, 2009) proposent effectivement une méthode analytique de quantification rapide qui permet d'éviter des étapes de préparation de l'échantillon qui peuvent induire des biais dans les résultats (extraction séquentielle par différents solvants, par exemple) et l'utilisation d'outils analytiques coûteux (spectrométrie de masse, électrophorèse capillaire...). Toutefois, les auteurs ne montrent pas la sélectivité de leur méthode vis-à-vis des nanoparticules de C₆₀; en effet, aucune étude sur les effets de matrices et la présence d'autres nanoparticules n'a été menée.

Évaluation de la toxicité aquatique de nanoparticules d'oxyde de titane (TiO₂) produites à partir des boues issues de l'étape de floculation d'eaux usées et d'eau de mer réalisée avec du tétrachlorure de titane (TiCl₄)

Analyse

La floculation est une étape du traitement des eaux potables et des eaux usées qui permet de diminuer la turbidité de l'eau en facilitant la décantation des matières en suspension. Les coagulants/floculants les plus utilisés sont des sels d'aluminium et de fer. Toutefois, il a été montré que l'utilisation de sels de titane, et plus particulièrement le tétrachlorure de titane (TiCl₄), permettait d'obtenir d'aussi bons rendements tout en minimisant la quantité finale de boues produites. De plus, en incinérant les boues produites (à 600 °C), il est possible de générer du dioxyde de titane (TiO₂) à partir des résiduels de TiCl₄ présents dans les boues; ce TiO₂ pouvant ensuite être utilisé dans de nombreuses applications.

Si les niveaux de risque liés à l'inhalation de TiCl₄ sont connus pour l'Homme (LOEC de 0,01 mg/m³ pour une exposition intermédiaire - 15 à 364 jours - par inhalation et de 0,0001 mg/m³ pour une exposition chronique par inhalation - plus de 365 jours) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1997), les auteurs (Lee *et al.*, 2009) déclarent qu'il n'existe pas de données pour les risques liés au titane sous forme ionique (Ti⁴⁺) dans les eaux pour l'être humain. La toxicité de TiO₂ a déjà été évaluée par des bioessais en utilisant *D. magna* et *V. fischeri*, comme organisme cibles. Ainsi Lovern et Klaper (2006) ont montré que le TiO₂ sous forme agrégée ne présentait aucune toxicité, alors que les particules de TiO₂ filtrées à 0,22 µm présentaient une DL₅₀⁽¹⁶⁾ de 5,5 mg/L et 100 % de mortalité à 10 mg/L.

Dans leur étude, Lee *et al.* (2009) ont testé, la floculation par TiCl₄ sur des eaux usées artificielles ainsi que sur de l'eau de mer. Le TiO₂ produit à partir des boues a été caractérisé par diffraction des rayons X (DRX), par détermination de la surface spécifique, par ses capacités photocatalytiques et par EDS. La toxicité des ions résiduels de TiCl₄ et celle des nanoparticules de TiO₂ a été évaluée en terme de DL₅₀ et de mortalité sur *D. magna* et la EC₅₀⁽¹⁷⁾ par des tests Microtox[®]. Les valeurs de NOEC⁽¹⁸⁾ et de LOEC⁽¹⁹⁾ ont également été déterminées pour *D. magna* et *V. fischeri*.

La taille des nanoparticules de TiO₂ obtenues par ce procédé est de 6 nm pour les boues issues de la floculation de l'eau usée et de 40 nm pour celles issues du traitement de l'eau de mer. La NOEC et la LOEC du TiCl₄ envers *D. magna* ont été trouvées égales à 100 et 150 mg/L, respectivement. Aucune valeur n'a pu être établie pour les nanoparticules de TiO₂. Les tests Microtox[®] ont permis d'établir la EC₅₀ à 739,4 mg/L pour TiCl₄ et à 650,6 mg/L pour le TiO₂, produit à partir des boues issues du traitement des eaux usées.

Commentaire

L'utilisation de sels de titane pour la floculation des eaux n'est pas une pratique courante en Europe puisque ce sont majoritairement les sels d'aluminium et les sels de fer qui sont utilisés. Si l'on ne peut remettre en cause leur efficacité dans le processus de floculation, rien ne permet d'affirmer qu'il n'y pas de risques environnementaux et sanitaires dans l'utilisation de sels de titane pour la floculation des eaux usées et *a fortiori* pour celle des eaux potables. L'utilisation de ces sels de titane doit encore être validée par des tests complémentaires car, comme l'ont signalé les deux publications précédentes, l'évaluation des risques liés aux nanoparticules passent par des étapes de caractérisation qui vont bien plus loin que les simples tests Microtox[®]. Cette publication (Lee *et al.*, 2009) ne peut donc être prise que comme une ébauche d'évaluation des risques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans la première publication analysée (Kato *et al.*, 2009), les auteurs ont développé un test de toxicité *in vitro* basé sur la mesure de la dynamique de diffusion de la lumière qui permet d'accéder aux propriétés de sédimentation, d'agglomération et de diffusion des nanoparticules. L'accès à ces propriétés permet de prédire la toxicité des nanoparticules; toutefois, le protocole mis au point devrait être couplé à l'étude morphologique de ces nanoparticules pour prendre en compte l'ensemble des paramètres qui régissent la toxicité de ces composés.

La deuxième publication (Sene *et al.*, 2009) utilise elle aussi la diffraction de lumière, mais comme outil de quantification des nanoparticules. Les avantages du protocole analytique mis au point reposent sur l'absence d'extractions séquentielles par solvant et sur le seuil de quantification assez bas de la méthode (17 µg.L⁻¹). Toutefois, le protocole mis au point ne concerne que la détection du C₆₀, soit un seul des composés de la famille des fullerènes.

Enfin, la dernière publication (Lee *et al.*, 2009) étudie la toxicité des nanoparticules de TiCl₄ utilisés comme agent de floculation pour le traitement des eaux usées et celui de l'eau de mer. Les tests Microtox[®] ont permis d'établir la EC₅₀ à 739,4 mg/L pour TiCl₄ et à 650,6 mg/L pour le TiO₂.

La présence de nanoparticules dans l'environnement peut avoir des implications importantes à la fois pour l'environnement et pour la santé humaine. Les nanosciences et les nanotechnologies sont une source potentielle de progrès dans de nombreux domaines. Toutefois, les nanotechnologies sont également une source potentielle de risques. L'utilisation croissante de nanoparticules conduira inévitablement à l'accroissement de leur présence dans l'environnement. Évaluer (de façon précise) les risques environnementaux relatifs aux nanoparticules requiert des méthodes

analytiques quantitatives fiables pour déterminer leur mobilité, leur réactivité, leur écotoxicité et leur persistance. Les articles analysés dans cette note d'étape montre les progrès accomplis dans ce domaine, et traduisent le fait que seules des techniques couplées permettront d'établir l'innocuité sanitaire et environnementale des nanoparticules dans l'environnement.

Lexique

- (1) Nanoparticule : particule de dimension inférieure à 100 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$).
- (2) Halloysite : Composé minéral de formule $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, présent naturellement dans toutes les formations argileuses.
- (3) Hématite : composé minéral de formule Fe_2O_3 .
- (4) Magnétite : composé minéral de formule Fe_3O_4 .
- (5) Fullerènes : famille de molécules composées uniquement de carbone, se présentant sous forme de sphère, d'ellipsoïde, de tube ou d'anneau. Le plus petit fullerène connu a pour formule C_{20} , le plus répandu est le C_{60} .
- (6) Nanocluster : agglomérat d'atomes constituant une nanoparticule.
- (7) MCDA : Multi-Criteria Decision Analysis.
- (8) Control-Banding : analyse des risques par élaboration de zones (ou bandes) de dangers en fonction des propriétés physico-chimiques et toxicologiques spécifiques des composés ciblés.
- (9) Solubilité : quantité maximale d'un composé capable de se dissoudre dans un solvant donné.
- (10) Coefficient de partage octanol/eau : rapport entre la concentration à l'équilibre d'une substance chimique dans l'octanol et la concentration en cette même substance dans l'eau. L'octanol représente le comportement des lipides. Plus ce coefficient est élevé, plus le composé aura tendance à s'accumuler dans les êtres vivants.
- (11) FMPS : Fast Mobility Particle Sizer. Spectromètre à mobilité électrique permettant d'obtenir la distribution de tailles de particules présentes dans un volume donné.
- (12) MEB : Microscopie Electronique à Balayage (terme anglais : SEM = Scanning Electron Microscopy). Technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon.
- (13) EDS : Energy Dispersive Spectroscopy = Analyse Dispersive en Energie. Technique consistant à étudier les rayonnements X des atomes constituant l'échantillon analysé.
- (14) DLS/DDL : Dynamic Light Scattering = Diffusion Dynamique de la Lumière. Cette technique mesure des fluctuations d'intensité en fonction du temps qui apparaissent lorsque les particules sont soumises au mouvement brownien. L'analyse de ces fluctuations d'intensité permet la détermination d'une distribution de coefficient des particules qui sont converties en distribution à l'aide de théories établies.

- (15) DMEM : Dubelcco's Modified Eagle Medium. Milieu de culture constitué d'eau, de sels organiques, de source de carbone et d'énergie (glucose), de sources d'azote (acides aminés) et de facteurs de croissance (vitamines, acides gras).
- (16) DL_{50} : Cet indicateur donne la concentration d'un composé chimique causant la mort de 50 % d'une population donnée. Il est associé à une durée d'exposition.
- (17) EC_{50} : Concentration d'un composé chimique diminuant de 50 % la luminescence de *V. fischeri* dans le test Microtox®.
- (18) NOEC : No Observed Effect Concentration.
- (19) LOEC : Lowest Observed Effect Concentration.

Publications analysées

- Kato H, Suzuki M, Fujita K et al.** Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for *in vitro* toxicology assessment. *Toxicol In Vitro*. 2009 ; 23(5):927-34.
- Lee BC, Kim S, Shon HK et al.** Aquatic toxicity evaluation of TiO₂ nanoparticle produced from sludge of TiCl₄ flocculation of wastewater and seawater. *J. Nanopart. Res.* 2009 ; 11(8):2087-96.
- Sene JA, Pinheiro McVB, Krambrock K et al.** Quantification of fullerene nanoparticles suspensions in water based on optical scattering. *Talanta*. 2009 ; 78(4-5):1503-7.

Publications de référence

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** Toxicological profile for titanium tetrachloride. 1997. (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp101.pdf>).
- Campbell TA.** Measuring the nano-world. *Nanotoday*. 2009 ; 4(5):380-1
- Farré M, Gajda-Schranz K, Kantiani L et al.** Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009 ; 393(1):81-95.
- Lovern SB, Klaper R.** Daphnia magna mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C_{60}) nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.* 2006 ; 25(4):1132-7.
- Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM et al.** Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol. Sci.* 2008 ; 101(2):239-53.
- Woodrow Wilson International Center for Scholars:** <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>
- Zalk DM, Paik SY, Swuste P.** Evaluating the Control Banding Nanotool: a qualitative risk assessment method for controlling nanoparticle exposures. *J. Nanopart. Res.* 2009 ; 11(7):1685-704.

Revue de la littérature

Crosera M, Bovenzi M, Maina G et al. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *Int Arch. Occup. Environ. Health.* 2009.

Elder A, Lynch I, Grieger K et al. Human health risks of engineered nanomaterials: Critical knowledge gaps in nanomaterials risk assessment. *Nanomaterials: Risks and Benefits*, Linkov I and Steevens J (eds.). NATO Sci. for Peace and Security Series C: Environ. Security. 2009 ; 3-29.

Linkov I, Steevens J, Chappell M et al. Classifying nanomaterial risks using multi-criteria decision: Analysis. *Nanomaterials: Risks and Benefits*, Linkov I and Steevens J (eds.). NATO Sci. for Peace and Security Series C: Environ. Security. 2009 ; 179-91.

Lowry GV, Casman EA. Nanomaterial transport, transformation, and fate in the environment: A Risk-Based Perspective on Research Needs. *Nanomaterials: Risks and Benefits*, Linkov I and Steevens J (eds.). NATO Sci. for Peace and Security Series C: Environ. Security. 2009 ; 125-37.

Simonet BM, Valcárcel M. Monitoring nanoparticles in the environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009 ; 393(1):17-21.

Publication non sélectionnée

Tsai SJ, Ada E, Isaacs JA et al. Airborne nanoparticle exposures associated with the manual handling of nanoalumina and nanosilver in fume hoods. *J. Nanopart. Res.* 2009 ; 11(1):147-61.

Cette publication n'a pas été retenue car elle traite des nanopoudres dans l'air et non pas dans l'eau. Pourtant cette publication est très pertinente du point de vue évaluation des risques professionnels; elle s'intéresse en effet à l'environnement de travail des manipulateurs de nanoparticules solides et des exigences réglementaires ayant trait aux sorbonnes et hottes aspirantes, afin d'éviter le risque « inhalation » pour les manipulateurs.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Bioessais, Eau, Évaluation des risques, Exposition, Milieu aquatique, Métrologie, Nanomatériaux, Nanotechnologie, Nanoparticule, Toxicité.