

# Génotoxicité des nanoparticules

Période : septembre 2009 à décembre 2009

Mary-Line JUGAN et Marie CARRIÈRE

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

Mots clés : Barrières cellulaires, CoCr, Génotoxicité, *In vitro*, *In vivo*, TiO<sub>2</sub>

Même si les publications dans le domaine de la nanotoxicologie sont en grande majorité focalisées sur l'étude de la capacité des nanomatériaux à promouvoir la mort des cellules, de plus en plus d'articles s'intéressent à des altérations plus subtiles de la cellule. L'exemple le plus présent dans la littérature récente est l'induction de dommages à l'ADN par certains nano-objets, dont l'une des conséquences directes est la cancérogenèse (pour revue, Singh *et al.*, 2009). Les deux articles sélectionnés montrent que des nanoparticules manufacturées à usage thérapeutique, ou présentes dans les produits de consommation courante, possèdent la capacité de provoquer des dommages à l'ADN sur des modèles de cellules et des souris.

## Les nanoparticules peuvent provoquer des dommages à l'ADN à travers une barrière cellulaire

### Analyse

Plusieurs études réalisées *in vitro* ont montré que des cellules en culture exposées directement à des nanoparticules pouvaient subir différents types de dommages cellulaires (pour revue, Kroll *et al.*, 2009). En revanche, l'effet des nanoparticules (NP) sur des cellules indirectement exposées n'a jamais été exploré. Bharbra *et al.* (2009) ont étudié l'hypothèse qu'une barrière cellulaire, formée par une couche confluyente de cellules, pourrait protéger des fibroblastes<sup>(1)</sup> humains des dommages provoqués par des NP constituées d'un alliage cobalt-chrome (CoCr), NP qui entrent dans la constitution de prothèses orthopédiques. Ces travaux utilisent un tapis de cellules de choriocarcinome trophoblastique<sup>(2)</sup> pour modéliser une barrière biologique de type placentaire. Ces cellules, les cellules Bewo, sont cultivées sur des inserts poreux, au-dessus d'un puits dans lequel sont cultivés des fibroblastes. Les cellules Bewo forment ainsi une barrière et les NP peuvent être insérées en dessous ou au-dessus de cette barrière pour une exposition respectivement directe ou indirecte des fibroblastes. Les auteurs ont exposé des fibroblastes, de façon directe ou indirecte, à une suspension de NP CoCr de 29,5 nm de diamètre. Une exposition directe ou indirecte des fibroblastes pendant 24 heures a provoqué des dommages à l'ADN significatifs, en présence de 0,036 mg/cm<sup>2</sup> de NP. La quantité de dommages est équivalente avec les deux protocoles d'exposition. Ces dommages ont été mesurés par la technique de l'essai des comètes<sup>(3)</sup> en conditions alcalines, qui permet de détecter les cassures simple et double brin de l'ADN, ainsi que les sites abasiques<sup>(4)</sup> et par marquage des histones  $\gamma$ -H2AX<sup>(5)</sup>, typiquement présents lors de cassures double brin de l'ADN. Les auteurs ont également observé que les dommages à l'ADN induits par les NP en présence de la barrière de Bewo sont plus nombreux que les dommages observés en absence de cette couche cellulaire, suggérant que la barrière cellulaire contribue au processus qui génère les dommages. Des observations en microscopie électronique à

transmission mettent en évidence une internalisation des NP par les cellules Bewo, bien que les NP ne traversent pas la barrière, et restent localisées dans la partie superficielle des cellules. Les auteurs ont donc exploré l'hypothèse que les dommages à l'ADN des fibroblastes seraient liés à une voie de signalisation intercellulaire associée aux cellules Bewo. Les résultats ont montré que le blocage des jonctions communicantes<sup>(6)</sup> avec un inhibiteur permet de diminuer les dommages à l'ADN, qui deviennent non significatifs. Ces jonctions, connues pour être un outil de communication intercellulaire, sont donc impliquées dans les dommages. Cette communication médiée par les jonctions communicantes est dépendante de plusieurs métabolites, notamment l'ATP, qui participe à la communication intercellulaire par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires appelés récepteurs purinergiques P2. Les auteurs ont donc mis les fibroblastes en contact avec de l'ATP par une exposition directe, et ont observé une augmentation des dommages à l'ADN. De plus, les dommages liés à une exposition indirecte à des NP de CoCr sont réduits en présence de molécules qui hydrolysent l'ATP, d'inhibiteur de transfert d'ATP, ou d'inhibiteurs des récepteurs purinergiques P2. Ces résultats montrent que l'exposition de cellules Bewo à de faibles doses de NP active une voie de signalisation au sein de la barrière. Cette voie implique les jonctions communicantes *via* une libération d'ATP. L'ATP est libérée depuis la couche supérieure vers la couche inférieure de la barrière et pourrait contribuer aux dommages à l'ADN des fibroblastes.

### Commentaire

À l'heure du débat public sur les nanotechnologies, cette étude a été largement relayée par les journaux généralistes et a fait l'objet d'une médiation alarmiste. La majorité des cellules de mammifères communiquent entre elles par l'intermédiaire de ces jonctions et cette interaction est critique pour le développement et le fonctionnement normal des organismes pluricellulaires. L'idée qu'une exposition indirecte aux NP puisse produire des effets délétères par l'intermédiaire des jonctions communicantes

est nouvelle et nécessite d'être approfondie. Même si la barrière cellulaire Bewo modélise une barrière placentaire, ce modèle est très simplifié et ne permet pas de déduire qu'il existe un risque lié à l'exposition fœtale aux NP à travers le placenta. Ces résultats présentent surtout des implications utiles aux démarches d'évaluation de la toxicité des NP et notamment que l'évaluation du risque ne dépend pas uniquement de la faculté des nanoparticules à traverser des barrières biologiques. Il apparaît donc important d'intégrer l'étude des effets liés à une exposition indirecte aux NP dans les approches toxicologiques. Il est à noter que dans cette étude les NP sont peu caractérisées. De plus, les auteurs ont constaté la libération d'ions Cr ou Co dans le milieu de culture suite à une dissolution des NP, mais la discussion sur une potentielle contribution de ces ions aux dommages observés aurait mérité d'être approfondie.

## Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> induisent des dommages à l'ADN chez la souris

### Analyse

Les auteurs Trouiller *et al.* (2009) ont exploré les effets d'une exposition de souris à des NP de TiO<sub>2</sub> par voie orale, en particulier l'apparition de dommages à l'ADN et d'une inflammation. Pour ce faire, les souris ont été exposées à des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> de 25 nm, *via* l'eau de boisson. D'une part, des souris mâles adultes ont été exposées pendant 5 jours à des concentrations de 60 à 600 µg/mL. D'autre part, les effets des expositions fœtales ont été étudiés par l'exposition de souris gravides *via* l'eau de boisson, pendant 10 jours, à une concentration de 500 µg/mL. Dans les cellules de la moelle osseuse des souris exposées, les auteurs ont quantifié les foci de γ-H2AX<sup>(5)</sup>, typiquement présents au niveau des cassures double brin de l'ADN. La quantité de cassure augmente avec la dose à laquelle les souris sont exposées, de 10 %, 20 %, 25 % et 30 % à la suite d'une exposition à 50, 250, 500 mg/kg de NP, respectivement. Le test des comètes<sup>(3)</sup> en version alcaline met également en évidence que les NP-TiO<sub>2</sub> augmentent de 34 % la quantité de cassures simple et double brins de l'ADN présent dans les cellules sanguines de souris exposées à 500 mg/kg de TiO<sub>2</sub>. À cette concentration, les NP de TiO<sub>2</sub> multiplient également par deux la fréquence des micronoyaux<sup>(7)</sup> dans les cellules sanguines de souris, ce qui signe la présence de dommages chromosomiques. De plus, des cytokines<sup>(8)</sup> pro- et anti-inflammatoires ont été dosées dans le sang des souris exposées et les résultats montrent que les NP de TiO<sub>2</sub> induisent une réponse proinflammatoire, mais pas de réponse anti-inflammatoire. Les auteurs ont aussi examiné le degré de dommages oxydants de l'ADN, en mesurant les concentrations de 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-dG)<sup>(9)</sup> dans l'ADN de foie des souris exposées. La quantité de 8-oxo-dG est 1,5 fois plus élevée dans le foie des souris exposées à 500 mg/kg de NP, suggérant que les NP induisent des dommages oxydants dans le foie. Enfin, les auteurs montrent qu'une exposition maternelle à 500 mg/kg TiO<sub>2</sub> durant la gestation provoquait des délétions dans l'ADN des fœtus.

### Commentaire

Cette étude est la première à démontrer qu'après une exposition orale, les TiO<sub>2</sub> induisent des cassures et des dommages oxydants de l'ADN, des dommages chromosomiques, et l'inflammation chez la souris adulte et chez le fœtus. Ces effets sont source d'instabilité génétique, et pourraient donc potentiellement augmenter le risque de développement de cancers. La mise en évidence de ces effets dans différents compartiments (foie, moelle osseuse et sang) suggère un effet systémique des NP, et pose la question d'un danger potentiel de ces nanoparticules sur d'autres organes. La voie d'exposition orale est pertinente, étant donné la présence de TiO<sub>2</sub> dans plusieurs produits de consommation courante, tels que les dentifrices ou les colorants alimentaires. Même si ces dommages apparaissent après une exposition d'au moins 5 jours à des doses élevées chez la souris, cette étude démontre l'importance de considérer le risque potentiel de désordres génétiques et de développement de cancers liés à l'ingestion de NP de TiO<sub>2</sub> chez l'Homme.

### CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces deux études montrent que certaines NP utilisées à des fins thérapeutiques ou dans des produits de consommation courante peuvent générer des dommages à l'ADN sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. Les dommages causés à l'ADN peuvent avoir des conséquences graves s'ils ne sont pas réparés. Les approches utilisées mettent en évidence un risque potentiel lié à l'exposition à des NP spécifiques, mais ne permettent pas de conclure quant à un risque lié à une exposition de l'Homme à ces NP dans les conditions « réelles », telles que l'ingestion de nanoparticules présentes dans des produits de consommation, les doses auxquelles les personnes sont exposées étant méconnues. Il apparaît nécessaire de favoriser ce type de recherches sur l'Homme, en développant notamment des études d'expologie, indispensables pour démontrer de façon pertinente un lien éventuel entre l'exposition aux nanoparticules et une incidence accrue de cancer.

### Lexique

- (1) Fibroblaste : cellules principales du tissu conjonctif.
- (2) Choriocarcinome trophoblastique : tumeur épithéliale maligne qui dérive des cellules trophoblastiques, le trophoblaste correspondant à la couche cellulaire continue formée de fibroblastes qui limite l'œuf au 5<sup>e</sup> jour après la fécondation.
- (3) Test des comètes : technique d'électrophorèse sur gel d'agarose permettant de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées.

- (4) Sites abasiques: dégâts subits par l'ADN de type altération des sucres ou perte de bases.
- (5)  $\gamma$ -H2AX: marqueur qui permet de détecter les cassures double brin de l'ADN.
- (6) Jonctions communicantes: canaux qui traversent les membranes cellulaires et jouent un rôle crucial dans la communication entre les cellules.
- (7) Micronoyaux: entités présentes dans le cytoplasme des cellules, et qui proviennent de la perte de fragments chromosomiques, voire de chromosomes.
- (8) Cytokines: substances solubles de communication synthétisées par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules et/ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction.
- (9) 8oxodG: lésion de l'ADN par oxydation de la base guanine, liée à un stress oxydant, et mutagène.

### Publications analysées

**Bhabra G, Sood A, Fisher B et al.** Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. *Nat. Nanotechnol.* 2009; 4(12):876-83.

**Trouiller B, Reliene R, Westbrook A et al.** Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. *Cancer Res.* 2009; 69(22):8784-9.

### Publications de référence

**Singh N, Manshian B, Jenkins GJS et al.** NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 2009; 30(23-24):3891-914.

**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: 370-377.

### Revue de la littérature

**Gonzalez L, Lison D, Kirsch-Volders M.** Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology.* 2008; 252-273

**Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M et al.** Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--many questions, some answers. *Mutat. Res.* 2009; 681(2-3):241-58.

**Lindberg HK, Falck GCM, Suhonen S et al.** Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 2009; 186(3):166-73.

**Robbens J, Vanparys C, Nobels I et al.** Eco-, geno- and human toxicology of bio-active nanoparticles for biomedical applications. *Toxicology.* 2010; 269(2-3):170-81.

### Publications non sélectionnées

**Huang S, Chueh PJ, Lin YW et al.** Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO<sub>2</sub> long-term exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 241(2):182-94.

*Les auteurs n'évoquent nulle part la caractérisation de leurs nanoparticules.*

### Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

DNA damage, Genetic alteration, Nanogenotoxicity, Nanotoxicity, Oxidative stress.