

Impact de nanoparticules sur des végétaux

Période : septembre 2009 à décembre 2009

Camille LARUE et Marie CARRIÈRE

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

Mots clés : Cellules, Écotoxicité, Génotoxicité, Nanoparticules, Nanotubes, Plantes

L'incorporation de nanomatériaux (nanoparticules, nanotubes...) dans les biens de consommation courante (crèmes solaires, pneus, emballages alimentaires...) entraîne, à terme, leur dissémination dans l'environnement soit par l'usure normale des produits soit à cause d'un mauvais recyclage. D'autre part, des nanoparticules entreraient dans la formulation de certains produits phytosanitaires, leur utilisation conduirait donc à une dissémination volontaire de nanoparticules. Ainsi, les différents compartiments de l'environnement (eau, sol, air) ainsi que les différentes espèces y vivant (bactéries, animaux, végétaux...) pourraient être contaminés. Les végétaux représentent un point d'entrée potentiel dans la chaîne alimentaire, puisqu'ils constituent une part essentielle de l'alimentation animale et humaine. Il est donc important d'évaluer leur contamination par les nanoparticules.

Les premières études relatant l'impact des nanoparticules sur les végétaux ont été publiées en 2007. Les résultats présentés sont souvent contradictoires. Certains constatent une activation du métabolisme de l'épinard par des TiO_2 (Su *et al.*, 2009) quand d'autres observent des inhibitions d'élongation racinaire ou de la photosynthèse (Racuciu *et al.*, 2009). Une équipe met en évidence l'internalisation racinaire, le transfert aux parties aériennes et la transmission de nanoparticules de carbone d'une génération à l'autre chez le riz (Lin *et al.*, 2009). Les articles commentés dans cette note précisent certains mécanismes conduisant à ces effets.

Les nanotubes de carbone pénètrent l'enveloppe des graines et affectent leur germination et leur croissance

Analyse

Khodakovskaya *et al.* (2009) réalisent une étude sur la pénétration et les effets des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT) sur des graines de tomate.

Les expositions sont faites dans un gel contenant des concentrations de 10, 20 et 40 mg/L de MWCNT. Cette exposition entraîne une germination plus rapide (en 3 jours) et plus efficace. Ainsi, après 12 jours d'exposition, 32 % des graines témoin, non exposées, germent, contre 74 et 82 % des graines exposées respectivement à 10 et 40 mg/L de MWCNT. La biomasse totale est 2,5 fois plus importante et la tige plus longue lorsque les graines sont exposées aux MWCNT. En revanche, le système racinaire n'est pas modifié. Une hypothèse des auteurs pour expliquer ces effets est que les MWCNT permettraient une meilleure imbibition⁽¹⁾ de la graine. L'humidité des graines a alors été évaluée : 38,9 % pour les témoins et 57,6 % pour les graines exposées après 2 jours. Une étude par spectroscopie Raman⁽²⁾ permet d'observer ces nanotubes à l'intérieur de la graine. Ils sont également visibles en Microscopie Électronique à Transmission (MET) dans les racines issues de ces graines germées. Les MWCNT peuvent donc pénétrer l'enveloppe de la racine et augmenter son imbibition d'où une germination et une croissance accrues. Les auteurs supposent que les MWCNT agissent soit en créant des pores dans l'enveloppe de la graine, permettant le passage de l'eau ou qu'ils régulent l'action d'aquaporines⁽³⁾ comme c'est

le cas lors d'un stress anoxique ou de l'exposition à certains métaux lourds.

Commentaire

L'originalité de cet article réside dans le modèle d'étude : aucune étude, à notre connaissance, ne relate les effets des nanomatériaux sur les graines des végétaux. Si la méthode employée pour la production des MWCNT est bien décrite, la caractérisation (taille, état d'agglomération, présence de résidus de catalyseurs de synthèse...) n'est pas étudiée. Pourtant, ces caractéristiques peuvent jouer un rôle très important dans les effets observés, c'est le cas par exemple de la présence de métaux lourds, souvent employés comme catalyseurs de synthèse et dont des résidus contaminent souvent le lot de nanotubes produits. Les auteurs soulignent que les résultats mis en évidence paraissent intéressants dans le cadre de l'utilisation des nanomatériaux en agriculture : ces derniers augmenteraient le rendement de germination des graines. Néanmoins, les nanotubes pénétreraient ensuite dans les racines de la plante. Dans l'état actuel des connaissances de la toxicologie de ces objets, il paraît donc inadéquat de les utiliser à cet effet, car ils pourraient contaminer les végétaux produits.

L'état d'agglomération des nanotubes de carbone conditionne leur toxicité sur une suspension de cellules d'*Arabidopsis* T87

Analyse

Lin *et al.* (2009) évaluent dans cet article l'impact de nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT) et de fibres d'amiante sur des cellules isolées d'*Arabidopsis thaliana*. Les cellules sont exposées à des MWCNT mis en suspension dans de l'eau déionisée dans des états d'agglomération différents. Dans le premier cas, aucun traitement supplémentaire n'est adjoint à la préparation : les MWCNT sont agglomérés et le diamètre moyen des agglomérats est de quelques centaines de μm . Dans le second cas, ils sont sonifiés pendant 6 heures et le diamètre des agglomérats est alors réduit à quelques dizaines de μm . Le nanotube individuel a été caractérisé avant sonification (9,5 nm de diamètre, 1,5 μm de long). Une analyse par ICP-MS⁽⁴⁾ révèle la teneur en métaux résiduels des nanotubes avant et après sonification. La pureté des nanotubes passe ainsi de 94,7 % de carbone à 95,2 % après sonification.

Après exposition des cellules à ces nano-objets, à raison de 10 mg/L, seules les fibres d'amiante entraînent une modification de la morphologie des cellules. En Microscopie Électronique à Transmission (MET), aucun nanotube n'est observé à l'intérieur des cellules. La masse sèche des cellules est peu modifiée après exposition aux MWCNT agglomérés, cependant elle diminue drastiquement après exposition aux fibres d'amiante et aux MWCNT faiblement agglomérés, traduisant une mortalité cellulaire. Ces mêmes effets sont observés sur la viabilité cellulaire, après 7 jours d'exposition à 10-600 mg/L de MWCNT. Celle-ci diminue lorsque la concentration en MWCNT augmente. D'autre part, la teneur en chlorophylle est plus faible lorsque les cellules sont exposées aux MWCNT que lorsqu'elles sont non exposées ou exposées aux fibres d'amiante. Enfin, une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD⁽⁵⁾) est constatée uniquement lorsque les cellules sont exposées aux MWCNT faiblement agglomérés. Ce paramètre atteste d'un stress oxydant dans les cellules exposées. L'amiante n'a pas d'effet sur ce paramètre.

Ainsi, la taille des agglomérats conditionne fortement la toxicité des MWCNT envers les cellules végétales. Fortement agglomérés, ils sont peu toxiques alors que faiblement agglomérés, ils sont hautement toxiques. Leur toxicité est alors supérieure à celle des fibres d'amiante. Les auteurs ne peuvent pas exclure que cette plus forte toxicité soit liée à la différence de teneur d'éléments sous forme de traces. Une hypothèse avancée est que du fait de leur plus faible taille les MWCNT faiblement agglomérés peuvent pénétrer à l'intérieur d'un amas de cellules, s'y accumuler et déclencher une réponse d'hypersensibilité de même qu'elles le feraient pour un agent pathogène, ce qui à terme mène à la mort de la cellule.

Commentaire

Cette étude met en évidence les effets toxiques pour les cellules végétales de MWCNT agglomérés, en rapport avec la taille des agglomérats. Malgré la toxicité des MWCNT, il est rassurant de constater que les nanotubes fortement agglomérés (non sonifiés) sont peu toxiques, car il est fort probable que ce soit leur état en cas de dissémination dans l'environnement. De plus, l'article précise la taille des agglomérats mais on ne sait pas si cette dernière a été mesurée dans l'eau ou dans un milieu biologique, dans lequel les nanomatériaux ont encore plus tendance à s'agglomérer.

Les nanoparticules d'argent sont génotoxiques pour l'oignon (*Allium cepa*)

Analyse

La publication de Kumari, Mukherjee, Chandrasekaran (2009) a pour but d'élucider les effets génotoxiques⁽⁶⁾ de nanoparticules d'argent sur des cellules du méristème apical⁽⁷⁾ d'oignon.

Le diamètre moyen des nanoparticules est inférieur à 100 nm, elles sont dispersées par sonification à haute puissance pendant 30 min dans de l'eau. L'exposition est réalisée sur des racines de plante entière qui sont ensuite analysées par microscopie.

L'observation microscopique indique que l'index mitotique⁽⁸⁾ après 4 heures d'exposition diminue graduellement lorsque la concentration en nanoparticules augmente de 25 à 100 $\mu\text{g/L}$. Il passe ainsi de 60,3 % pour les cellules de racines non exposées à 27,6 % pour les cellules exposées à 100 $\mu\text{g/L}$. De plus, les cellules qui se divisent semblent bloquées en prophase⁽⁹⁾ puisqu'on passe de 97,6 % cellules en prophase chez les témoins à 99,6 % pour les racines exposées à 100 $\mu\text{g/L}$ de nanoparticules d'argent. Enfin, le taux d'aberrations chromosomiques varie selon la concentration en nanoparticules. À 25 $\mu\text{g/L}$, il n'y a pas de différence significative par rapport au témoin. À 50 $\mu\text{g/L}$, des dérèglements lors de la métaphase⁽¹⁰⁾, des pontages dans l'ADN et des phénomènes d'adhérence sont observés. Dès 75 $\mu\text{g/L}$ apparaissent des cassures chromosomiques et enfin à 100 $\mu\text{g/L}$, les auteurs constatent une importante cytotoxicité, qui se traduit par une désintégration complète des parois de nombreuses cellules.

En conclusion, les nanoparticules d'argent sont cyto et génotoxiques pour les cellules de méristème apical d'oignon avec une diminution de l'index mitotique et l'apparition de nombreux dommages à l'ADN lors de la mitose⁽¹¹⁾.

Commentaire

Peu d'études relatent jusqu'à présent des effets génotoxiques de nanoparticules sur des cellules de plantes. Le modèle utilisé dans cet article est très pertinent puisqu'utilisé dans le cadre du programme international de sécurité chimique de l'OMS.

De plus, les cellules de méristème sont semblables aux cellules souches humaines, c'est-à-dire peu différenciées. Quant aux nanoparticules d'argent, elles sont largement utilisées pour leurs

propriétés antibactériennes et incluses dans la composition de nombreux produits de consommation courante, donc fortement susceptibles de se retrouver dans l'environnement.

Malheureusement, cette étude se contente de la caractérisation physico-chimique des nanoparticules affichée par le fournisseur qui stipule uniquement un diamètre inférieur à 100 nm. Leur taille réelle, leur possible dissolution et leur état d'agglomération ne sont pas identifiés, autant de critères jugés importants pour évaluer la toxicité de nanoparticules. En particulier, il est reconnu que les nanoparticules d'argent ont fortement tendance à se dissoudre (Pal *et al.*, 1997), les effets observés pourraient donc être uniquement dus aux ions argent dissous. Néanmoins, si les effets observés sont réellement liés à la présence de nanoparticules, les résultats présentés sont préoccupants: si la prolifération cellulaire est bloquée au niveau des méristèmes, la plante ne sera plus approvisionnée en nouvelles cellules et ne pourra plus croître, c'est ainsi l'équilibre des écosystèmes qui serait menacé à terme.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces études montrent que le consensus n'est toujours pas atteint concernant la phytotoxicité des nanomatériaux. Alors que l'on sait maintenant que les caractéristiques de ces derniers sont primordiales pour déterminer leur potentielle toxicité, il reste encore trop d'études où leurs caractéristiques physico-chimiques ne sont pas détaillées. Il est donc impossible d'attribuer de façon certaine les effets notés (génotoxicité par exemple) à la présence de nanomatériaux. Néanmoins, on peut dégager deux faits importants pour la sécurité sanitaire et de l'environnement. Les nanomatériaux pourraient pénétrer dans les organismes végétaux, s'y accumuler et ainsi entrer dans la chaîne alimentaire. Toutefois, il semble que ces nanomatériaux sous forme agglomérée soient beaucoup moins toxiques que sous forme dispersée, or il est très probable qu'en contact avec leur environnement elles s'agglomèrent.

Lexique

- (1) Imbibition: phase au cours de laquelle la graine s'imbibe d'eau avant de reprendre son métabolisme.
- (2) Spectroscopie Raman: technique de spectroscopie dont le principe est d'envoyer une lumière monochromatique sur un échantillon et à analyser la lumière diffusée.
- (3) Aquaporine: classe de protéines membranaires qui forment des pores perméables aux molécules d'eau dans les membranes biologiques.
- (4) ICP-MS: pour Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, technique qui permet de mesurer la quantité d'éléments traces dans des échantillons.
- (5) SOD: superoxide dismutase, enzyme impliquée dans les processus de régulation du stress oxydant des cellules.
- (6) Génotoxique: qui induit des dommages à l'ADN.
- (7) Méristème apical: zone de forte division cellulaire située à l'extrémité de la racine.
- (8) Index mitotique: il correspond au nombre de cellule en division, c'est-à-dire en mitose.
- (9) Prophase: c'est la première étape de la division cellulaire (mitose) pendant laquelle la chromatine se condense pour former les chromosomes.
- (10) Métaphase: la métaphase est la deuxième phase de la mitose. C'est le rassemblement des chromosomes à l'équateur de la cellule avant d'être séparés dans les deux cellules filles.
- (11) Mitose: elle désigne les événements chromosomiques de la division cellulaire. Ce phénomène permet aux cellules de se multiplier en plusieurs phases successives: prophase, métaphase, anaphase et télophase. Pendant ces phases, le matériel génétique est dupliqué puis réparti dans deux cellules filles.

Publications analysées

- Khodakovskaya M, Dervishi E, Mahmood M et al.** Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*. 2009; 3(10):3221-7.
- Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N.** Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci. Total Environ*. 2009; 407(19):5243-6.
- Lin C, Fugetsu B, Su Y et al.** Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *J. Hazard. Mater*. 2009; 170(2-3):578-83.

Publications de référence

- Lin S, Reppert J, Hu Q et al.** Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. *Small*. 2009; 5(10):1128-32.
- Pal T, Sau TK, Jana NR.** Reversible formation and dissolution of silver nanoparticles in aqueous surfactant media. *Langmuir*. 1997; 13(6):1481-85.
- Racuciu M, Creanga D, Olteanu Z.** Water based magnetic fluid impact on young plants growing. *Romanian Reports in Physics*. 2009; 61(2):259-68.
- Su M, Liu H, Liu C et al.** Promotion of nano-anatase TiO₂ on the spectral responses and photochemical activities of D1/D2/Cyt b559 complex of spinach. *Spectrochimica acta. Part A: Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2009; 72(5): 1112-6.

Revue de la littérature

Mishra VK, Kumar A. Impact of metal nanoparticles on the plant growth promoting Rhizobacteria. *Digest J. nanometer. Biostructures.* 2009 ; 4 (3):587-92.

Ruffini Castiglione M, Cremonini R. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia.* 2009 ; 62(2):161-5.

Publications non sélectionnées

Ahamed M, Posgai R, Gorey TJ et al. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010 ; 242(3):263-9.

Cette publication concerne un insecte et non une plante, sujet de cette note.

Laban G, Nies LF, Turco RF et al. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology.* 2010 ; 19(1):185-95.

Cette publication concerne un poisson et non une plante, sujet de cette note.

Miao AJ, Schwehr KA, Xu C et al. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.* 2009 ; 157(11):3034-41.

Cette publication concerne une algue et non une plante, sujet de cette note.

Tan XM, Lin C, Fugetsu B. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. *Carbon.* 2009 ; 47(15):3479-87.

Cet article a été écrit par la même équipe que celle concernant les cellules d'Arabidopsis qui a été détaillée dans cette note.

Simon-Deckers AI, Loo S, Mayne-L'hermite M et al. Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 2009 ; 43(21):8423-9.

Cette publication concerne les bactéries qui ne sont pas l'objet de cette note.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Algae, Bacteria, Ecotoxicology, Fish, Plant, Soil, Surface water, Toxicology.