

# Études de la génotoxicité de nanoparticules métalliques

Période : février 2010 à août 2010

Isabelle PASSAGNE et Béatrice L'AZOU

Université Bordeaux 2 – EA 3672 Santé – Travail – Environnement – Bordeaux

Mots clés : **Génotoxicologie, Nanomatériaux, Nanoparticules**

Plusieurs rapports gouvernementaux soulignent la nécessité d'évaluer l'impact des nanomatériaux sur la santé humaine. Cette évaluation passe par l'évaluation du potentiel toxique mais également par la détermination des propriétés génotoxiques.

La génotoxicité peut résulter d'un mécanisme direct *via* une interaction nanoparticule-ADN. Les nanoparticules étant peu fréquemment retrouvées dans le noyau, leur génotoxicité passerait plutôt par un mécanisme indirect avec production d'espèces réactives de l'oxygène. Actuellement, les données obtenues sur la génotoxicité des nanoparticules restent rares. Cette situation peut être due à l'absence de validation de procédures appropriées pour les nanomatériaux. Les protocoles standards ayant été optimisés pour des agents chimiques, ils pourraient ne pas fournir de résultats fiables avec les nanomatériaux.

## Pertinence des méthodes de génotoxicité pour l'analyse des effets induits par les nanoparticules

Pfaller T, Colognato R, Nelissen I, Favilli F, Casals E, Ooms D, Leppens H, Ponti J, Stritzinger R, Puentes V, Boraschi D, Duschl A, Oostingh GJ. The suitability of different cellular *in vitro* immunotoxicity and genotoxicity methods for the analysis of nanoparticle-induced events. *Nanotoxicology*. 2010; 4: 52-72.

### Analyse

Les auteurs jugent, de l'efficacité, entre autres, des tests de génotoxicité dans le domaine de la nanotoxicologie. Cette étude est réalisée dans le cadre d'un projet européen visant à développer des méthodes d'analyses en nanotoxicologie : DIPNA (Development of an Integrated Platform for Nanoparticles analysis to verify their possible toxicity and ecotoxicity). L'étude porte sur les nanoparticules d'or (4,5 nm) et d'oxyde de fer (7,3 nm). Deux tests de génotoxicité sont envisagés : le test des comètes ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE<sup>(1)</sup>) assay et le test du micronoyau avec blocage de la cytokinèse<sup>(2)</sup> ou Cytokinesis-Block MicroNucleus (CBMN<sup>(3)</sup>) assay. Le test des comètes met en évidence les cassures de l'ADN. La présence d'agrégats rendant l'interprétation difficile, ce test a dû être abandonné. Le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse est réalisé sur leucocytes humains cultivées *ex vivo* issus du sang de deux donneurs. La formation de micronoyaux est causée par un agent clastogène (perte d'un fragment de chromosome) ou aneugène (perte d'un chromosome entier) avec visualisation d'entités nucléaires dans le cytoplasme. Seules les lésions génotoxiques acquises et transmissibles sont comptabilisées. Il en ressort que les nanoparticules d'or n'induisent pas de génotoxicité. Pour les nanoparticules d'oxyde de fer, une légère augmentation du nombre de micronoyaux est observée pour le donneur 1. Toutefois, ce résultat est non significatif lorsqu'une moyenne est réalisée avec les données des différents donneurs.

Les dommages à l'ADN peuvent être causés par une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène. L'évaluation des ROS<sup>(4)</sup> est donc une étape importante. Cette analyse est effectuée à l'aide d'une sonde DCFH-DA<sup>(5)</sup> sur cellules pulmonaires exposées aux nanoparticules. Deux protocoles différents de mesure sont comparés : la spectrofluorimétrie<sup>(6)</sup> et la cytométrie en flux<sup>(7)</sup>. La mesure par spectrofluorimétrie révèle une augmentation de la production de ROS après exposition aux nanoparticules d'or, alors que cela n'est pas observé en cytométrie. Néanmoins, cette augmentation n'est pas significative. Les deux méthodes de mesure sont utiles mais nécessitent des contrôles appropriés. En effet, les nanoparticules métalliques peuvent interférer en augmentant les propriétés spectrales du fluorochrome<sup>(8)</sup>.

### Commentaire

Ce projet décrit les différentes méthodes de génotoxicité choisies ainsi que les problèmes techniques rencontrés. Les auteurs justifient l'utilisation de la méthode du micronoyau en nanotoxicologie du fait d'une bonne reproductibilité. L'interprétation des résultats passe nécessairement par le calcul d'une tendance entre les différents donneurs. L'utilisation de lignées cellulaires permettrait de résoudre ce problème de variabilité inter-donneurs. Toutefois, les résultats obtenus semblent en accord avec ceux de la littérature. En effet, Auffan *et al.* (2006) concluent à la non-génotoxicité des nanoparticules d'oxydes de fer (20 nm). De même, la génotoxicité des nanoparticules d'or n'a pas été démontrée. Ces nanoparticules réduiraient la formation d'espèces réactives oxygénées et nitrées (Shulka *et al.*, 2005) en jouant sur l'activité de certains facteurs de transcription comme AP1<sup>(9)</sup> et NFkB<sup>(10)</sup> (Kataoka, Handa, Nishizawa, 2001). Une étude récente a néanmoins mis en évidence qu'à faibles doses, les nanoparticules d'or induisent des dommages oxydants (Li *et al.*, 2008). Ces discordances de résultats confirment le fait que plusieurs tests de génotoxicité

sont nécessaires avant de conclure à la génotoxicité de nanoparticules.

## Étude de la génotoxicité de nanoparticules de dioxydes de titane et d'alumine

Di Virgilio AL, Reigosa M, Arnal PM, Fernández Lorenzo de Mele M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J Hazard Mater.* 2010; 177: 711-718

### Analyse

Les auteurs évaluent la génotoxicité de nanoparticules de  $\text{TiO}_2$ <sup>(11)</sup> (dioxyde de titane,  $20 \pm 7$  nm) et de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ <sup>(12)</sup> (alumine,  $28 \pm 19$  nm) via la méthode des échanges entre chromatides-sœurs (SCE)<sup>(13)</sup> en complément de celle des micronoyaux. Le test SCE témoigne de la permutation d'ADN d'une chromatide à l'autre au sein d'un même chromosome, suite à la présence de lésions non réparées. En cas d'échanges, les deux chromatides-sœurs sont marquées différemment par le bromo-désoxyuridine (BrdU)<sup>(14)</sup>.

La lignée choisie est la lignée CHO-K1<sup>(15)</sup>, connue pour être sensible aux nanoparticules. La mesure de la viabilité cellulaire montre un effet cytotoxique dose-dépendante après 24 h d'exposition aux différentes nanoparticules. L'observation des cellules en microscopie électronique à transmission montre que les nanoparticules sont internalisées et se retrouvent dans des vésicules. Elles ne pénètrent pas dans le noyau.

Concernant la génotoxicité, une induction significative des échanges de chromatides sœurs est observée après 24 h d'exposition aux nanoparticules de  $\text{TiO}_2$ . L'induction de SCE pourrait être associée à la surface vaste des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (trois fois plus élevée que celle des nanoparticules d' $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Ces nanoparticules induisent également une augmentation de la fréquence des micronoyaux. Contrairement aux résultats de SCE, les nanoparticules d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  induisent une augmentation du nombre de micronoyaux, traduisant une génotoxicité.

Les auteurs proposent une analyse comparative entre les résultats obtenus sur  $\text{TiO}_2$  et ceux de la littérature. Dans la majorité des cas, les résultats obtenus sont en accord avec ceux des études antérieures avec des micronoyaux observés dans des cultures de cellules lymphoblastoïdes et dans des fibroblastes SHE (Syrian hamster embryo fibroblasts). Deux études sur cellules CHO-K1 présentent des résultats contradictoires (Theogaraj *et al.* 2007; Warheit *et al.*, 2007) mais ceci pour des expositions courtes (3 à 4 h) contre 24 h dans l'étude de Di Virgilio *et al.* (2010). La réponse biologique dépend bien de la durée d'exposition.

### Commentaire

Un intérêt de cette étude est d'utiliser la méthode des échanges de chromatides sœurs, qui détecte les effets précoces contrairement au test des micronoyaux. L'utilisation de ces méthodes complémentaires a permis de mettre en évidence la génotoxicité des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  et d' $\text{Al}_2\text{O}_3$ . L'absence de localisation nucléaire des nanoparticules suggère un mécanisme indirect de génotoxicité.

Un autre intérêt de cette étude est d'apporter des informations sur la génotoxicité des nanoparticules d' $\text{Al}_2\text{O}_3$ , nanoparticules encore peu étudiées. Une précédente étude *in vivo* a démontré leur génotoxicité avec augmentation des micronoyaux et apparition d'aberrations chromosomiques (Balasubramanyam *et al.* 2009). Aucun effet n'a été observé avec le test d'Ames (Balasubramanyam *et al.*, 2010). Ce résultat justifie une nouvelle fois l'utilisation de plusieurs tests pour évaluer la génotoxicité.

Les auteurs ont essayé d'établir des paramètres clés influençant la génotoxicité, en comparant leurs résultats à ceux de la littérature. Les paramètres physico-chimiques fournis étant parfois insuffisants, il est difficile de comparer les données scientifiques et d'isoler les conditions amenant à une génotoxicité. Une revue récente a d'ailleurs formulé des recommandations concernant la détermination de paramètres adéquats pour la caractérisation des nanomatériaux (Gonzalez *et al.*, 2008).

### CONCLUSION GÉNÉRALE

Les travaux décrits ci-dessus évaluent le potentiel génotoxique de nanoparticules métalliques. Les résultats sont en accord avec ceux de la littérature, laissant craindre que certaines nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  puissent engendrer des dommages de l'ADN.

L'évaluation de la génotoxicité passe par une meilleure compréhension des mécanismes impliqués : est-elle liée à une interaction directe avec l'ADN ou est-elle une conséquence d'un stress oxydant ? L'utilisation d'approches méthodologiques complémentaires est importante dans cette optique. En effet, la microscopie électronique à transmission a déjà apporté quelques informations en démontrant la localisation nucléaire de nanoparticules d'or ; phénomène expliquant leur génotoxicité en l'absence de stress oxydant.

### Lexique

- (1) SCGE assay: Single Cell Gel Electrophoresis assay ou test des comètes; mesure la fragmentation de l'ADN induite par un agent génotoxique
- (2) Cytokinèse: la cytokinèse: étape correspondant à la division du cytoplasme dans les dernières phases de la méiose et de la mitose, afin de former des cellules filles.
- (3) CBMN: Cytokinesis-Block MicroNucleus assay, test de mutations chromosomiques.
- (4) ROS: reactive oxygen species ou espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , radicaux libres superoxydes  $\text{O}_2^-$  et hydroxyles  $\cdot\text{OH}$ ) produites de façon accrue lors d'un stress oxydant.
- (5) DCFH-DA: 2'-7' dichlorofluoresceine diacétate, composé non fluorescent qui est hydrolysé par les estérases intracellulaires en dichlorofluoresceine (DCFH) et qui réagit avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$  pour former la dichlorofluoresceine (DCF) fluorescente.

- (6) Spectrofluorimétrie : mesure de la fluorescence d'un composé en cuve à quartz après excitation.
- (7) Cytométrie en 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.
- (8) Fluorochrome : substance capable d'émettre de la fluorescence après excitation, appelée également fluorophore.
- (9) AP1 : facteur de transcription jouant un rôle essentiel dans l'activation de la prolifération cellulaire.
- (10) NFκB : Facteur de transcription dans la réponse inflammatoire et l'apoptose.
- (11) TiO<sub>2</sub> : dioxyde de titane.
- (12) Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : alumine.
- (13) SCE : échanges de chromatides sœurs, test qui met en évidence une erreur de réplication provenant d'une permutation d'ADN d'une chromatide à l'autre.
- (14) BrdU : précurseur marqué de l'ADN qui s'incorpore lors de la réplication.
- (15) CHO-K1 : cellules d'ovaires de hamster (Chinese Hamster Ovary).

## Revue de la littérature

- Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR.** DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res.* 2009; 674: 101-108.
- Gonzalez L, Lison D, Kirsch-Volders M.** Genotoxicity of engineered nanomaterials: a critical review. *Nanotoxicology.* 2008; 2: 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: 241-258.
- Møller P, Jacobsen NR, Folkmann JK, et al.** Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free Radic Res.* 2010; 44: 1-46.
- Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, et al.** NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials.* 2009; 30: 3891-3914.

## Publications de référence

- Auffan M, Decome L, Rose J, et al.** *In vitro* interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environ Sci Technol.* 2006; 40: 4367-4373.
- Balasubramanyam A, Sailaja N, Mahboob M, et al.** Evaluation of genotoxic effects of oral exposure to aluminum oxide nanomaterials in rat bone marrow. *Mutat Res.* 2009; 676: 41-47.
- Balasubramanyam A, Sailaja N, Mahboob M, et al.** *In vitro* mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the *Salmonella*/microsome assay. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24: 1871-1876.

**Kataoka K, Handa H, Nishizawa M.** Induction of cellular antioxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/small Maf by anti-rheumatic gold(I) compounds. *J Biol Chem.* 2001; 276: 34074-34081.

**Li JJ, Zou L, Hartono D, et al.** Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts *in vitro*. *Adv Mater.* 2008; 20: 138-142.

**Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, et al.** Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir.* 2005; 21: 10644-10654

**Theogaraj E, Riley S, Hughes L, et al.** An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles. *Mutat Res.* 2007; 634: 205-219.

**Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, et al.** Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO<sub>2</sub> particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett.* 2007; 171: 99-110.

## Autres publications identifiées

**Barillet S, Jugan ML, Laye M, et al.** *In vitro* evaluation of SiC nanoparticles impact on A549 pulmonary cells: Cyto-, genotoxicity and oxidative stress. *Toxicol Lett.* 2010; 198: 324-330. *Article intéressant sur l'évaluation de nanoparticules peu étudiées de SiC mais par le test des comètes, test déjà cité dans la NAS.*

**Colon J, Hsieh N, Ferguson A, et al.** Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2. *Nanomedicine.* 2010; 6: 698-705.

*Article portant sur l'effet radioprotecteur de certaines nanoparticules.*

**Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H.** Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol.* 2010; sous presse.

*Article utilisant une méthode de détection des adduits par post-marquage au P<sup>32</sup>.*

**Hackenberg S, Friehs G, Kessler M, et al.** Nanosized titanium dioxide particles do not induce DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 2010; sous presse.

*Article utilisant le test des comètes.*

**López-Moreno ML, de la Rosa G, Hernández-Viezcás JA, et al.** Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO<sub>2</sub> Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants. *Environ Sci Technol.* 2010; 44: 7315-7320.

*Article sur la toxicité des nanoparticules inorganiques sur des plants de soja.*

**Park MV, Verharen HW, Zwart E, et al.** Genotoxicity evaluation of amorphous silica nanoparticles of different sizes using the micronucleus and the plasmid lacZ gene mutation assay. *Nanotoxicology.* 2010; sous presse.

*Article utilisant une technique moins courante de recherche de mutation.*

**Shi Y, Zhang JH, Jiang M, Zhu LH, et al.** Synergistic genotoxicity caused by low concentration of titanium dioxide nanoparticles and p,p'-DDT in human hepatocytes. *Environ Mol Mutagen.* 2010; 51: 192-204.

*Article étudiant la génotoxicité liée à une co-exposition au DDT et aux nanoparticules de titane.*

**Tsaousi A, Jones E, Case CP.** The *in vitro* genotoxicity of orthopaedic ceramic ( $Al_2O_3$ ) and metal (CoCr alloy) particles. *Mutat Res.* 2010; 697: 1-9.

*Article utilisant la méthode CBMN et une méthode d'immunomarquage de l'histone H2AX, dont la phosphorylation signe le début de la réparation, deux approches déjà discutées dans la NAS.*

**Wang C, Gao X, Su X.** Study the damage of DNA molecules induced by three kinds of aqueous nanoparticles. *Talanta.* 2010; 80: 1228-1233.

*Article étudiant la formation de dommages sur l'ADN mais avec une exposition UV.*

**Wise JP Sr, Goodale BC, Wise SS, et al.** Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquat Toxicol.* 2010; 97: 34-41.

*Article intéressant mais réalisé sur des cellules d'organismes aquatiques.*

### **Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique**

DNA damage, Genotoxicity, Genotoxicology, Nanomaterial, Nanoparticle.