

Existe-t-il un lien entre caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux et leur écotoxicité ?

Période : Décembre 2013 à Mars 2014

Camille Larue | camille.larue@rub.de

Ruhr Universität Bochum – Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie – Bochum – Allemagne

Mots clés : caractérisation physico-chimique, diamètre, dissolution, écosystème aquatique, écotoxicologie, enrobage, environnement, nanoparticule

Alors que les nanotechnologies se développent très vite (1) et sont même qualifiées de nouvelle révolution industrielle par le gouvernement français (2), leurs impacts sur l'environnement sont toujours peu connus. La fin de l'année 2013 a vu la mise en place de la déclaration obligatoire des nanomatériaux produits et importés sur le territoire français (3). La base de données co-gérée par l'Anses et l'analyse qui en a découlé, ont mis en évidence la difficulté d'obtenir des informations fiables et de choisir des paramètres pertinents pour la déclaration (identification chimique du matériau notamment). Elle souligne également une très grande diversité de nanomatériaux et d'utilisations. Des études au cas par cas des effets de ces différents nanomatériaux sur l'environnement représentent une quantité de travail astronomique et prendraient des dizaines d'années. Les questions qui découlent donc de ces constats sont : Est-il possible de regrouper les nanomatériaux en classes possédant un comportement (toxicité) similaire ? Sur quel(s) critère(s) seraient fondés ces regroupements ?

Dans cette note, trois articles sont présentés investiguant l'influence de la taille, de l'enrobage et de la solubilité sur la toxicité de trois types de nanoparticules (NPs) : le dioxyde de titane, l'argent et l'oxyde de zinc.

Utilisation de nanoparticules de TiO₂ fonctionnalisées au citrate pour étudier l'effet de la taille des particules sur leur toxicité envers l'embryon du poisson-zèbre.

Kim M-S, Louis KM, Pedersen JA, Hamers RJ, Peterson RE, Heideman W. Using citrate-functionalized TiO₂ nanoparticles to study the effect of particle size on zebrafish embryo toxicity. *Analyst* 2014; **139**:964-72.

Résumé

Cet article traite des effets photo-induits de nanoparticules (Nps) de dioxyde de titane (TiO₂) de 6, 12 et 15 nm enrobées de citrate (stabilisant) sur l'embryon du poisson *Danio rerio*. Ces NPs sont largement utilisées dans l'industrie pour leurs propriétés photocatalytiques ou comme filtre UV ; on les retrouve notamment dans les produits cosmétiques. Les auteurs démontrent que, lorsque les NPs sont illuminées (lumière simulant la lumière du soleil sous 1 m d'eau), celles de 6 nm sont les plus toxiques pour les embryons, avec une mortalité plus importante (LC₅₀¹ de 23,4 mg/L pour 6 nm, 610 mg/L pour 12 nm et non déterminable pour 15 nm). D'autre part, une exposition à 500 mg/L entraîne des problèmes de développement embryonnaire pour 85 % des individus exposés (15 % pour le groupe témoin, 55 % et 40 % pour les groupes exposés aux NPs de 12 et 15 nm respectivement). Il est à noter que ces effets ne sont pas détectés lorsque les NPs ne sont pas illuminées. Ces effets sur les individus sont en lien avec la quantité de radicaux

hydroxyles produite par les NPs : celles de 6 nm en produisent deux et trois fois plus que les NPs de 12 et 15 nm respectivement. Par conséquent, la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les embryons exposés aux NPs de 6 nm est également plus importante et généralisée dans tout l'organisme. Les NPs de 6 nm entraînent également significativement plus de dommages à l'ADN que les particules de tailles plus importantes.

Commentaire

Cet article met en évidence un lien inversement proportionnel entre le diamètre de la NP et sa toxicité, cette toxicité étant imputée à la quantité d'espèces réactives de l'oxygène produite par les NPs. Dans le cadre de cette étude, le diamètre nominal² et le diamètre hydrodynamique³ des NPs varient en parallèle (les NPs avec le plus faible diamètre nominal sont également celles qui forment les plus petits agglomérats en solution) et ne nous permettent donc pas de tirer de conclusion quant à l'importance relative de ces deux paramètres sur la toxicité des NPs. D'un point de vue général, cette question est intéressante lorsqu'il s'agit de savoir si les NPs agglomérées conservent le même potentiel toxique que les NPs individualisées.

Sur ces dernières, les différences de toxicité sont observables dans une très petite gamme de tailles (6 à 15 nm), les NPs de 15 nm étant nettement moins toxiques. Il aurait été intéressant d'inclure une taille supplémentaire (de l'ordre de 30 nm par

exemple) pour essayer de déterminer un diamètre-seuil entraînant la toxicité. On peut avancer l'hypothèse que la toxicité induite ne s'étendrait pas à toute la gamme de taille des NPs telles qu'elles sont aujourd'hui arbitrairement définies (1 à 100 nm) ce qui remet donc en exergue le débat sur la définition des NPs : faut-il prendre en considération uniquement la taille de la particule (<100 nm) ou également l'apparition de nouvelles propriétés qui la différencient du même matériau à une échelle microscopique (4) ? Si un diamètre-seuil (en dessous duquel la toxicité était détectée) existe, cela pourrait aider à restreindre le champ des recherches en (éco)-toxicologie des NPs.

Dans la discussion, les auteurs abordent également un autre point qui fait débat dans le domaine de la nanotoxicologie : les unités utilisées pour quantifier les NPs dans un milieu d'exposition : massique (mg/L), surfacique (m²/L) ou numérique (nombre de particules/L). Dans cette étude, les résultats sont principalement présentés en unité massique, mais lorsque les auteurs les expriment selon les deux autres unités, les différences entre NPs ne sont plus aussi évidentes voire disparaissent. Il serait donc intéressant, dans le futur, d'employer ces différentes unités dans les études toxicologiques.

Toxicité de nanoparticules d'argent de tailles et d'enrobages différents pour la bactérie *Pseudomonas putida* : risques pour l'environnement aquatique ?

Matzke M, Jurkschat K, Backhaus T. Toxicity of differently sized and coated silver nanoparticles to the bacterium *Pseudomonas putida* : risks for the aquatic environment? *Ecotox* 2014; DOI 10.1007/s10646-014-1222-x

Résumé

Cette étude s'intéresse à la toxicité de l'argent (Ag) sous forme d'ions ou de nanoparticules (NPs) de 8 à 60 nm, avec enrobage (citrate, acide tannique) ou sans, sur une culture en flasque de *Pseudomonas putida* (bactéries des sols et des eaux). A ce jour, les NPs d'Ag sont très employées en nanotechnologie, en particulier pour leurs propriétés antibactériennes. La dissémination de ces NPs dans l'environnement interroge donc quant à la pérennité des écosystèmes microbiens.

Les auteurs ont caractérisé sept NPs différentes (diamètre, enrobage) avant exposition, mais n'ont pu le faire durant l'exposition en raison de trop faibles concentrations dans le milieu (quantité de NPs en dessous des limites de détection des appareils de caractérisation). La conclusion de l'étude est que la forme ionique est la plus toxique et qu'aucune des caractéristiques testées (diamètre, enrobage) n'a pu expliquer les différences de toxicité entre les NPs. *Pseudomonas putida* est un organisme particulièrement sensible, avec une EC₅₀⁴ de 0,16 µg/L pour la forme ionique et de 0,25 à 13,4 µg/L pour les NPs.

Dans la discussion, les auteurs postulent que la toxicité des NPs d'Ag est principalement déterminée par leur dissolution dans le milieu. Mais les interconnexions entre les différents facteurs (enrobage, solubilité, diamètre) sont complexes, et

aucune règle générale n'est déductible. Ils avancent donc que l'évaluation des risques peut être basée sur la concentration totale en argent dissous qui est la forme la plus toxique. Quant à la question du risque actuel lié à la dissémination de NPs d'Ag dans l'environnement, les concentrations actuellement relevées sont trop variables (six ordres de grandeur) pour pouvoir tirer une conclusion, il faut procéder à une étude au cas par cas.

Commentaire

A l'inverse du précédent article, les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence un effet de la taille – ou de l'enrobage – des NPs sur leur toxicité. Néanmoins, dans ce cas, une analyse statistique multivariée (variables : diamètre nominal², diamètre hydrodynamique³ et enrobage) aurait été nécessaire et aurait pu révéler des effets plus fins non détectables sans analyse statistique. Une particule de taille micrométrique en supplément aurait également été intéressante pour compléter cette gamme. Un autre paramètre qui aurait pu être étudié pour expliquer la toxicité des NPs est leur solubilité, puisque les auteurs concluent après analyse de la littérature que ce facteur est déterminant pour la toxicité des NPs.

La discussion de l'article est intéressante et aborde de nombreux aspects tels que la nature des micro-organismes (biofilm ou bactérie isolée), les caractéristiques physico-chimiques des NPs (formation d'agglomérats notamment) ou encore les conditions d'exposition qui influencent la solubilité des NPs. Enfin, cet article met surtout en évidence la difficulté d'étudier le comportement et la toxicité des NPs dans l'environnement à des concentrations réalistes. Aujourd'hui, les recherches sont limitées par des problèmes techniques de détection, empêchant ainsi la compréhension des mécanismes d'action. Ici, selon les données disponibles (5), les concentrations d'Ag dans les eaux de surface seraient potentiellement de l'ordre des EC₅₀⁴ déterminées dans cet article et suggèrent donc qu'il existe un risque pour les bactéries de ces milieux.

Toxicité de nanoparticules d'oxyde de zinc envers *Daphnia magna* : effets de taille et de dissolution

Lopes S, Ribeiro F, Wojnarowicz J, Lojkowski W, Jurkschat K, Crossley A, Soares AMVM, Loureiro S. Zinc oxide nanoparticles toxicity to *Daphnia magna* : size-dependent effects and dissolution. *Environ Toxicol Chem* 2014;33:190-8.

Résumé

Cet article se focalise sur différents effets toxiques induits par le zinc (Zn) sous forme ionique ou sous forme de nanoparticules (NPs) d'oxyde de zinc (ZnO) sur la daphnie (*Daphnia magna*), en relation avec le diamètre des particules (30, 80 et > 200 nm) et leur solubilité. Ces NPs sont actuellement utilisées dans divers produits tels que les crèmes solaires, les dentifrices, les peintures ou encore en tant qu'additif alimentaire. Leur toxicité aiguë a été évaluée par la détermination de la LC₅₀¹ qui prend en compte

l'immobilisation des daphnies. Elle varie de 0,76 mg/L pour les ions à 1,32 mg/L pour les NPs de 80 nm. La capacité de nutrition des daphnies a été étudiée après 24 h d'exposition. Ce paramètre est réduit, en particulier pour les NPs de 30 nm. Après la fin de l'exposition, la nutrition n'est pas revenue à son niveau normal. Enfin, les auteurs ont évalué la toxicité chronique des NPs (21 jours d'exposition) via des indicateurs de reproduction. Ils ont ainsi mis en évidence une diminution de la descendance et de la longueur des femelles et ce, quel que soit le traitement. La conclusion de l'étude est que la détermination de la taille des NPs ainsi que de leur solubilité est primordiale pour évaluer les effets des NPs de ZnO sur la daphnie.

Commentaire

Cette étude comme la précédente indique que le lien entre diamètre, dissolution et toxicité n'est pas si évident à établir dans le cas des NPs de ZnO, même si ces paramètres semblent jouer un rôle important. Il est dommage que les auteurs ne fournissent pas de données plus précises dans le corps du texte concernant le diamètre nominal² des NPs et se contentent d'un « 80-100 nm » et d'un « >200 nm ». Dans ce cas, une particule de diamètre inférieur à 10 nm aurait également été un plus, puisque de nombreuses études montrent que les effets « nano » sont plus marqués pour les très petites NPs (4). Enfin, le choix des concentrations d'exposition qui diffèrent selon le traitement (ion, 30 nm, 80-100 nm, >200 nm) ne semble pas justifié et peu pertinent pour pouvoir faire des comparaisons entre ces différents traitements.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans le contexte actuel du fort développement des nanotechnologies et donc de la dissémination de NPs dans l'environnement, il est urgent de fournir des réponses quant aux risques inhérents. L'obstacle principal réside aujourd'hui dans l'infinie variété des NPs. Il serait donc important d'être capable de classer ces NPs en fonction de leur toxicité pour accélérer cette évaluation. Actuellement, les études scientifiques s'intéressent donc à mettre en évidence des liens entre les différentes caractéristiques physico-chimiques des NPs et leur toxicité. Les articles sélectionnés dans cette note ont été choisis pour représenter différents types de NPs et couvrir divers organismes. L'étude portant sur les NPs de TiO₂ a mis en évidence un lien entre le diamètre des NPs et leur toxicité, lorsque ces dernières étaient illuminées. Les deux autres études sur les NPs d'Ag et de ZnO n'ont, quant à elles, pas pu faire ce lien en faisant apparaître une interconnexion complexe entre différents paramètres et concluent donc au besoin de poursuivre les études au cas par cas.

Il semble ainsi qu'un premier niveau de classification selon le degré de solubilité des NPs serait pertinent. Pour les NPs non solubles (TiO₂), un deuxième niveau de classement à étudier serait celui du diamètre (nominal ou hydrodynamique, reste à déterminer). Pour les NPs solubles, le rôle de la dissolution dans les phénomènes de toxicité est indéniable ; il faut maintenant déterminer de manière plus générale si l'effet de ces ions est le paramètre déterminant ou s'il existe un effet lié à la forme nanométrique (internalisation plus aisée dans les organismes par exemple). La question de l'influence de l'enrobage sur la toxicité reste pour l'instant assez floue. Deux autres constatations ressortent de l'analyse de la littérature. La première est la prédominance des études sur des organismes aquatiques, les organismes terrestres étant représentés de façon marginale. Il existe donc un manque d'informations flagrant sur ce sujet, à combler. Enfin, la deuxième constatation est que l'évaluation des risques est aujourd'hui limitée par l'approche technique qui ne permet pas d'étudier les nanomatériaux à des concentrations réalistes par rapport à leur dissémination estimé, alors qu'il a été mis en évidence que les fortes doses d'exposition pouvaient entraîner des biais (agglomération des NPs par exemple) et donc fausser les conclusions.

GENERAL CONCLUSION

With the rapid development of nanotechnology and the concomitant release of NPs in the environment, it is important to assess their ecotoxicity. The main obstacle is the wide variety of NPs. To overcome this issue and urge the conclusion, a classification of NPs according to their toxicity would be necessary. The articles presented here were chosen to represent soluble vs. insoluble NPs and different organisms. The paper on TiO₂ NPs has evidenced a direct link between NP diameter and their photo-toxicity. Inversely, the two other studies dealing with the impact of Ag and ZnO NPs have not been able to reach the same observations and conclude to a complex interconnexion between different parameters (size, shape, solubility...).

Thus a first ranking might be made between soluble and insoluble NPs. For insoluble NPs (TiO₂) a second criterion to study would be NP diameter (nominal or hydrodynamic). For soluble nanomaterials, the role of dissolution is undebatable, one needs to know if ions are the principal contributor for toxicity or if the nano form is also part of the scheme (eased internalization in organisms for instance). The influence of NP functionalization remains unclear.

Two other main facts are evidenced with this analysis. The first one is that most of the studies are performed on aquatic organisms; there is a huge need of studies on the terrestrial ecosystem. The second one is that so far risk assessment is limited by technical issues such as NP detection at realistic concentrations. We need to overcome this bottleneck to be able to progress on this question since high concentrations might lead to some bias (NP agglomeration, sedimentation, decrease bioavailability...)

Lexique

- (1) LC₅₀: LC signifie concentration mortelle (lethal concentration). C'est un indicateur de toxicologie répandu qui indique la concentration nécessaire pour entraîner la mortalité de 50 % des individus.
- (2) diamètre nominal : il représente le diamètre physique d'une nanoparticule isolée.
- (3) diamètre hydrodynamique : il définit le diamètre des nanoparticules, couvertes de leur première sphère d'hydratation, lorsqu'elles sont en suspension. Il traduit ainsi les phénomènes d'agglomération et de dispersion dans les milieux aqueux.
- (4) EC₅₀ : EC signifie concentration efficace. Cet autre indicateur, très répandu en toxicologie, représente la concentration nécessaire pour atteindre 50 % de l'effet maximal d'un produit.

Publications de référence

- (1) www.nanotechproject.org. *The project on emerging nanotechnologies*.
- (2) Teillant, A., *La note d'analyse : Pour un développement responsable des nanotechnologies*, D. durable, Editor. 2011. p. 12.
- (3) Anses, *Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire : Rapport d'étude*. 2013.

Revue de la littérature

- (4) Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner M. *Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective*. *Nat Nano*, 2009. 4(10):p. 634-641.
- (5) Gottschalk, F., Sun, TY., Nowack, B. *Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies*. *Environ. Pollut.* 2013;181: 287-300.

Autres publications identifiées

Ribas Ferreira JL, Lonné MN, Franc TA, *et al.* Co-exposure of the organic nanomaterial fullerene C60 with benzo[a]pyrene in *Danio rerio* (zebrafish) hepatocytes : Evidence of toxicological interactions. *Aquatic Toxicol.* 2014; 147: 76-83.

Cet article s'intéresse à l'effet de «cheval de Troie» qui peut apparaître en cas de co-contamination.

Ribeiro F, Gallego-Urrea JA, Jurkschat K, *et al.* Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Sci Total Environ* 2014;466-467:232-41

Cette étude s'intéresse à la toxicité de l'argent sur trois espèces aquatiques en parallèle.

Vitorge E, Szenknect S, Martins JM, *et al.* Comparison of three labeled silica nanoparticles used as tracers in transport experiments in porous media. Part II: Transport experiments and modeling. *Environ Pollut* 2014 ; 184 : 613-619

La synthèse de NPs marquées permettrait d'atteindre des limites de détection plus basses.

Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent :

- n'avoir aucun conflit d'intérêts ;
 avoir un ou plusieurs conflits d'intérêts.