

# Écotoxicologie des nanomatériaux : nouvelles approches analytiques

Période : décembre 2014 - mars 2015

**Camille LARUE** | [camille.larue@ensat.fr](mailto:camille.larue@ensat.fr)

CNRS – Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement (ECOLAB) – Toulouse – France

Mots clés : **écotoxicologie, environnement, marquage, modélisation, nanoparticule, organisme, outil analytique**

Quatre ans après la publication de la note ayant pour titre « Écotoxicologie des nanoparticules : avancées méthodologiques dans l'évaluation des risques » (1), cette note a pour objectif de refaire le bilan sur les progrès réalisés dans le domaine. En effet, la période de veille écoulée a été marquée par la publication de nombreuses revues de la littérature contenant notamment le mot-clef « analytical » : concept analytique, approche analytique, technique analytique, méthode analytique (2-5). Ainsi, après une dizaine d'années d'investigations en écotoxicologie des nanomatériaux, les chercheurs font un point en termes de techniques utilisées pour la caractérisation, la détection et la détermination des effets des nanoparticules (NPs). Lorsque les premières études ont débuté, les outils et approches classiques d'écotoxicologie ont été appliqués à ce contaminant émergent qu'étaient les NPs. L'expérience a permis de démontrer que certaines méthodes pouvaient être appliquées telles quelles, que d'autres étaient biaisées par la nature des NPs et donc non utilisables ou encore que certaines autres devaient être adaptées. Malgré ces progrès, la constatation reste la même : le manque d'outils performants limite toujours la prédiction et la gestion des risques, notamment dans le cas de problématiques environnementales (échantillons complexes, dilués,...). Cette note s'intéresse donc au développement de nouvelles techniques (marquage isotope stable, KED ICP-MS1) ainsi qu'à l'émergence de la modélisation des risques à partir de modèles pré-existants originaux ou adaptés.

## Le challenge de l'étude de la bioaccumulation des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> à des concentrations environnementales : utilisation cruciale du marquage avec des isotopes stables

**Bourgeault A, Cousin G, Geertsen V, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, Durupthy O, Chanéac C, Spalla O.** The challenge of studying TiO<sub>2</sub> nanoparticle bioaccumulation at environmental concentrations: crucial use of a stable isotope tracer. *Environ Sci Technol* 2015; **49**: 2451-59.

### Résumé

Les NPs de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sont produites et utilisées en grande quantité dans les produits de consommation courante (cosmétiques, colorants alimentaires,...). L'étude de leur devenir dans l'environnement reste difficile car le titane (Ti) est un élément naturellement présent dans les sols, les eaux (par exemple 80 µg/L dans l'eau de Seine, (6)) et les organismes (1 à 50 µg/g, (7-8)). Une solution pour s'affranchir de ce bruit de fond est la synthèse de NPs de TiO<sub>2</sub> avec une signature isotopique différente de celle du Ti géogénique (c'est-à-dire formé par des processus naturels). Le Ti possède 5 isotopes naturels, le <sup>48</sup>Ti étant le plus abondant (73,8 %). Les auteurs ont synthétisé des NPs (anatase, 10 nm) enrichies en <sup>47</sup>Ti (95,7 % vs. abondance naturelle 7,3 %). Elles ont servi à étudier le transfert du Ti dans les moules via l'eau d'exposition et/ou via la nourriture à de faibles concentrations (max 120 µg/L) selon trois protocoles : (i) 1h avec des NPs dans l'eau, (ii) 1h avec des NPs dans l'eau et avec de la nourriture, (iii) 1h

selon la procédure précédente suivie de 72h de dépuración. Les taux d'absorption par les moules des NPs seules dans le milieu d'exposition ou en présence de nourriture sont assez similaires (3,2 et 5,5 L/g<sub>moule</sub>/jr respectivement). Après dépuración, les résultats montrent que l'efficacité d'assimilation<sup>2</sup> par la voie alimentaire est très faible (3 %). Cette étude suggère donc que les NPs de TiO<sub>2</sub> transitent principalement dans le système digestif des moules avec une très faible incorporation dans leurs organes internes.

### Commentaire

Au-delà des résultats scientifiques intéressants, la synthèse directe de NPs marquées avec des isotopes stables est un réel progrès pour étudier le devenir des NPs dans l'environnement. Cette approche par marquage avec des isotopes stables a été développée récemment pour d'autres éléments tels que le Zn (9). Elle va permettre d'élaborer des scénarii plus pertinents et réalistes au niveau environnemental (faible concentration, milieu complexe, fond géogénique). En effet, même si certaines modélisations prévoient des teneurs dans les eaux de surface de l'ordre du µg/L (10), la plupart des études en milieu aquatique ont été menées avec des concentrations beaucoup plus élevées. De plus, il a été montré que le comportement et l'impact des NPs à fortes concentrations n'est pas directement extrapolable aux faibles concentrations, du fait notamment de phénomènes d'agglomération et/ou sédimentation.

Dans cet article, les auteurs utilisent également une méthode efficace de minéralisation et quantification (KED ICP-MS) qui permet des mesures correctes de très faibles concentrations en

Ti dans tous types de matrices en éliminant les interférences. Enfin, ce travail met en évidence l'intérêt d'avoir accès aux caractéristiques des NPs à de très faibles concentrations, réalistes par rapport à l'exposition.

### Dynamique d'accumulation et toxicité aigüe des nanoparticules d'argent envers *Daphnia magna* et *Lumbricus variegatus* : implications pour les approches de modélisation des métaux

Khan FR, Paul KB, Dybowska AD, Valsami-Jones E, Lead JR, Stone V, Fernandes TF. Accumulation dynamics and acute toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* and *Lumbricus variegatus*: implications for metal modeling approaches. *Environ Sci Technol* 2015; **49**: 4389-97.

#### Résumé

Les NPs d'Ag sont utilisées pour leurs propriétés antibactériennes dans des produits tels que les vêtements de sport ou les emballages alimentaires. Cet article étudie la possibilité d'utiliser des modèles bien connus en écotoxicologie des métaux lourds dans les écosystèmes aquatiques (BLM<sup>3</sup>, TRA<sup>4</sup> et modèle biodynamique<sup>5</sup>) au cas particulier des NPs métalliques. Ces modèles prédisent la toxicité aigüe en fonction de différents paramètres : le taux d'absorption, le taux d'efflux, l'affinité du site de liaison et la teneur en contaminants dans les tissus de l'organisme à court terme. Des daphnies (*Daphnia magna*) et des vers (*Lumbricus variegatus*) ont été exposés à quatre sources d'Ag : des ions et trois NPs (10 nm de diamètre) avec différents enrobages (PVP<sup>6</sup>, PEG<sup>7</sup> et citrate) à des concentrations variant de 0 à 400 µg/L. Les auteurs ont déterminé les principaux biomarqueurs propres à chacun des modèles : le taux de prélèvement, le taux d'efflux, l'affinité du site de liaison et la charge des tissus à court terme. Les résultats montrent que les NPs d'Ag sont 2 à 10 fois moins accumulées que les ions. Ces résultats sont concordants avec les données de toxicité aigüe : plus l'absorption est importante plus la LC<sub>50</sub><sup>8</sup> est faible : d'une part pour le ver : LC<sub>50</sub> (Ag ionique) < LC<sub>50</sub> (PVP-AgNP) < LC<sub>50</sub> (PEG-AgNP) < LC<sub>50</sub> (citrate Ag-NP) et d'autre part pour la daphnie : LC<sub>50</sub> (Ag ionique) < LC<sub>50</sub> (PVP-AgNP) < LC<sub>50</sub> (citrate Ag-NP) < LC<sub>50</sub> (PEG-AgNP). La prédiction de la toxicité à court terme avec des approches BLM<sup>3</sup> et TRA<sup>4</sup> semble être appropriée quand l'accumulation et la toxicité aigüe sont liées à la concentration en ions Ag<sup>+</sup>. Cependant, l'utilisation de ces modèles est difficile pour des organismes qui sont exposés par voie alimentaire, à des métaux sous forme nanoparticulaire (ex: daphnie). Néanmoins, le taux d'absorption apparaît comme un bon indicateur de biodisponibilité pour prédire la toxicité aigüe chez ces deux organismes aquatiques.

#### Commentaire

Cet article met en évidence la tendance actuelle qui consiste à développer les approches par modélisation. Le premier pas logique dans cette démarche est d'étudier les modèles pré-existants. La conclusion de cette étude est que les modèles considérés ne sont valides que pour les ions dissous. La nature particulière des NPs fausse les prédictions. Cette constatation

renvoie à la question largement répandue qui est de savoir si les effets des NPs proviennent uniquement des ions libérés ou si la forme NP joue également un rôle. À ce jour, il n'y a pas de consensus à ce sujet. Cette publication souligne la nécessité de développer de nouveaux modèles capables de prendre en compte les caractéristiques des NPs, afin de les appliquer également à des NPs non métalliques (NPs carbonées) et/ou à des NPs à dissolution négligeable (TiO<sub>2</sub>).

Un autre point intéressant soulevé dans cet article est l'impact des enrobages sur la biodisponibilité et la toxicité des NPs. Si leur influence est étudiée sur la biodisponibilité des NPs, leur éventuel impact sur les ions dissous issus des NPs (chélation) est encore peu investigué à ce jour.

### Écotoxicologie numérique : prédiction simultanée des effets écotoxiques des nanoparticules avec diverses conditions expérimentales

Kleandrova VV, Luan F, Gonzalez-Diaz H, Ruso JM, Melo A, Speck-Planche A, Cordeiro MNDS. Computational ecotoxicology: simultaneous prediction of ecotoxic effects of nanoparticles under different experimental conditions. *Environ Inter* 2014; **73**: 288-94.

#### Résumé

Cet article envisage l'utilisation du modèle QSAR/QSTR<sup>9</sup> pour déterminer l'écotoxicité des NPs. Cet outil mathématique permet de prédire une réponse biologique en fonction de propriétés physico-chimiques d'une substance. Dans un premier temps, les auteurs ont réalisé une étude bibliographique pour rassembler des données pour alimenter leur modèle (5520 cas). Ils ont également déterminé les variables d'entrée : composition chimique des NPs, taille, forme, temps d'exposition, organismes, biomarqueurs. Seules les NPs non enrobées sont considérées dans ce modèle et les NPs sont également caractérisées par le volume molaire, l'électronégativité et la polarisabilité. Le but de ce modèle est de déterminer si les NPs sont écotoxiques ou non. Les auteurs ont alors comparé tous les cas (NP + organisme + conditions d'exposition) de la base de données deux à deux : le premier cas étant considéré comme une référence et le second comme inconnu. Les données sont séparées en deux ensembles : un jeu de données test (4133 cas) et un jeu de données validation (1387 cas). Le modèle ainsi élaboré a démontré une précision de 99 % pour les deux jeux de données. D'après ce modèle QSAR-perturbation, l'écotoxicité des NPs est proportionnelle à leur électronégativité et à leur polarisabilité et inversement proportionnelle à leur volume molaire et à leur taille. Le modèle a ainsi prédit la non-écotoxicité de 3 types de NPs de Ni (30, 60 et 100 nm) en accord avec les valeurs de LC<sub>50</sub> obtenues expérimentalement sur des embryons de poisson. Le modèle QSAR-perturbation apparaît comme un outil fiable, capable de prédire l'écotoxicité des NPs non enrobées dans des conditions expérimentales multiples.

#### Commentaire

Il serait extrêmement coûteux et long de tester la toxicité de tous les types de NPs existants envers de nombreux organismes. Un modèle capable de s'appliquer à différentes

NPs non enrobées, différents organismes et différentes conditions d'exposition a été développé pour répondre au manque de données expérimentales d'écotoxicité disponibles pour un grand nombre de NPs. Il constitue ainsi un outil relativement performant pour faire de l'évaluation des risques. La précision du modèle dépend de plusieurs paramètres : (i) la richesse de la base de données de départ, (ii) le choix des variables descriptives et (iii) la détermination de valeurs seuils qui ont ici été choisies de manière arbitraire. Ainsi, il serait envisageable d'ajouter comme variable d'entrée la présence et la nature d'un enrobage, le taux de dissolution de la NP ou encore la bioaccumulation des NPs dans les organismes dans une version plus avancée du modèle proposé par les auteurs. Une autre force de ce modèle est de pouvoir confronter des études disponibles mais dont les données ne sont pas homogènes. Cet outil a pour but de dégager de grandes tendances, et peut être très efficace pour une première investigation de grandes hypothèses (la toxicité vient majoritairement des ions libérés ou encore le diamètre des NPs conditionne leur toxicité). Il est à noter que ce modèle est applicable à la détermination d'une écotoxicité aiguë uniquement. L'élaboration de ce modèle ouvre de nombreuses perspectives (utilisations d'autres variables, (éco)toxicité chronique).

#### CONCLUSION GÉNÉRALE

L'étude de la bibliographie parue ces derniers mois résume bien les progrès faits depuis une dizaine d'années dans le champ de l'écotoxicologie des nanomatériaux et met également en relief les défis à venir. On assiste ainsi au développement de nouveaux outils performants tels que la synthèse de NPs avec des isotopes stables ou encore une technique dérivée de l'ICP-MS pour pouvoir détecter et quantifier les NPs dans des matrices complexes avec une sensibilité très élevée. L'écotoxicologie des nanomatériaux s'appuie également sur des méthodes pré-existantes dans d'autres disciplines (chimie, médecine) qui sont ensuite adaptées aux cas particuliers des NPs. C'est notamment le cas du modèle QSAR qui est prometteur car il permet de s'appuyer sur les résultats obtenus précédemment pour en tirer de grandes tendances qui pourront orienter plus précisément les recherches futures. Ces progrès sont extrêmement positifs et soulignent en particulier l'importance d'une recherche pluridisciplinaire. Il reste néanmoins de nombreux verrous à surmonter comme par exemple l'élaboration de protocoles standardisés ou encore le développement de techniques de caractérisation avec une détection beaucoup plus sensible.

#### GENERAL CONCLUSION

*The review of the literature published in recent months month summarizes progress made over the last decade and highlights new challenges. NPs ecotoxicity is a recent issue that has led to the development of efficient new tools (stable isotope labelling, KED ICP-MS) that detect and quantify NPs in complex matrices with very high sensitivity. Nano-ecotoxicology also relies on pre-existing methods from other disciplines (chemistry, medicine) that are then adapted to NPs issues. This is the case for the promising QSAR model which is quite promising since it uses previously published data that help predict major trends useful for directing future research. These breakthroughs are very exciting and highlight the importance of multidisciplinary research. However, we are still faced with challenges, such as the establishment of standardized protocols and the development of more sensitive characterization tools.*

#### Lexique

- (1) KED ICP-MS : Technique ICP-MS (spectroscopie par torche à plasma) qui permet de limiter les interférences entre atomes. KED signifie « collisional kinetic energy discrimination ».
- (2) Efficacité d'assimilation : C'est la différence entre le flux entrant et le flux sortant, c'est-à-dire ce qui est retenu dans l'organisme après 72h de dépuration.
- (3) BLM : Biotic Ligand Model : Modèle utilisé en écotoxicologie aquatique qui évalue la biodisponibilité d'un polluant métallique selon les propriétés de l'eau (pH, dureté, teneur en carbone organique dissous) ainsi que son affinité à s'accumuler sur les surfaces d'échanges des organismes (par exemple sur les branchies).
- (4) TRA : Tissue Residue Approach : Modèle d'écotoxicologie aquatique, basé sur la détermination de la concentration métaboliquement active d'un contaminant (organique ou métallique) dans les tissus de l'organisme, quelle que soit la voie d'exposition (ingestion, absorption).
- (5) Modèle biodynamique : Modèle qui prend en compte la dynamique des échanges entre l'environnement (à partir de l'eau ou de la nourriture) et l'organisme. Il se définit donc à partir de constantes d'ingestion et d'efflux à un moment donné.
- (6) PVP : Polyvinylpyrrolidone : Polymère organique utilisé classiquement comme agent dispersant.
- (7) PEG : Polyéthylène glycol : Polymère largement utilisé en médecine ou cosmétique pour ses propriétés hydro- et lipo-solubles.

- (8) LC 50 : Indicateur de toxicité d'une substance. C'est la concentration pour laquelle 50 % des organismes exposés meurent.
- (9) QSAR/QSTR : Relation quantitative structure (ou toxicité) à activité (en anglais : quantitative structure-activity (toxicity) relationship) est le procédé par lequel une structure chimique est corrélée avec un effet bien déterminé comme l'activité biologique ou la réactivité chimique. Ce modèle s'appuie sur le postulat de base que des objets chimiques similaires ont des activités similaires. Il est basé sur un jeu de données existant pour prédire la toxicité d'autres substances similaires.

### Publications de référence

- (1) Larue C, Carriere M. Écotoxicologie des nanoparticules : avancées méthodologiques dans l'évaluation des risques. *BVS* 2011; **15**: 10-14
- (2) Schaumann GE, Philippe A, Bundschuh M, et al. Understanding the fate and biological effects of Ag- and TiO<sub>2</sub>-nanoparticles in the environment: the quest for advance analytics and interdisciplinary concepts. *Sci Total Environ* 2014; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.10.035
- (3) Capaldi Arruda SC, Diniz Silva AL, Moretto-Galazzi R, et al. Nanoparticles applied to plant science: a review. *Talanta* 2015; **131**: 693-705.
- (4) Herrero-Latorre C, Alvarez-Mendez J, Barciela-Garcia J, et al. Characterization of carbon nanotubes and analytical methods for their determination in environmental and biological samples: a review. *Anal Chim Acta* 2015; **852**: 77-94.

### Revue de la littérature

- (1) Djuricic AB, Hang Leung Y, Ng AMC, et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization and avoiding experimental artefacts. *Small* 2015; **11**(1): 26-44.
- (2) Bour A, Mouchet F, Silvestre J, et al. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticules ecotoxicity : a review. *J Hazard Mater* 2015; **283**: 764-77.
- (3) Liu R, Lal R. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Sci Tot Environ* 2015; **514**: 131-39.

### Autres publications identifiées

- (1) Dan Y, Zhang W, Xue R, et al. Characterization of gold nanoparticle uptake by tomato plants using enzymatic extraction followed by single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis. *Environ Sci Technol* 2015; **49**: 3007-14.

*Cet article se focalise sur une nouvelle avancée technique: l'utilisation du single particle ICP-MS pour déterminer la quantité de NPs internalisée, leur taille et leur dissolution.*

- (2) Kar S, Gajewicz A, Puzyn T, et al. Periodic table-based descriptors to encode cytotoxicity profile of metal oxide nanoparticles: A mechanistic QSTR approach. *Ecotoxicol Environ Saf* 2014; **107**: 162-69.

*Article publié un peu avant la période de veille mais qui fournit un second exemple de l'approche QSTR appliquée aux NPs d'oxydes métalliques et l'organisme bactérien E. coli.*

- (3) Watson JL, Fang T, Dimkpa CO, et al. The phytotoxicity of ZnO nanoparticles on wheat varies with soil properties. *Biomaterials* 2015; **28**: 101-12.

*Cet article explore la possibilité d'utiliser des NPs de ZnO pour pallier aux déficiences de certains sols qui à leur tour impactent les populations.*

- (4) Dimkpa CO, McLean JE, Britt DW et al. NanoCuO and interaction with nanoZnO or soil bacterium provide evidence for the interference of nanoparticles in metal nutrition of plants. *Ecotox* 2015; **24**: 119-29.

*Cette étude s'intéresse aux effets de NPs dans un milieu complexe constitué d'un sol, d'une plante et de bactéries.*

- (5) Simonin M, Guyonnet JP, Martins JMF, et al. Influence of soil properties on the toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on carbon mineralization and bacterial abundance. *J Hazard Mater* 2015; **283**: 529-35.

*Ce papier étudie l'effet de faibles doses de NPs sur un temps d'exposition long sur des bactéries dans divers types de sol naturel.*

- (6) Koo Y, Wang J, Zhang Q, et al. Fluorescence reports intact quantum dot uptake into roots and translocation to leaves of *Arabidopsis thaliana* and subsequent ingestion by insect herbivores. *Environ Sci Technol* 2015; **49**: 626-32.

*Cet article présente une autre façon de détecter les NPs dans des tissus biologiques. Il s'intéresse également au transfert dans une chaîne trophique.*

- (7) Bour A, Mouchet F, Verneuil L, et al. Toxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles at different trophic levels – effects on diatoms, chironomids and amphibians. *Chemosphere* 2015; **120**: 230-36.

*Article intéressant qui investigate des organismes aquatiques selon trois niveaux de la chaîne trophique.*

- (8) Bone AJ, Matson CW, Colman BP, et al. Silver nanoparticle toxicity to atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) and *Caenorhabditis elegans*: a comparison of mesocosm, microcosm and conventional laboratory studies. *Environ Toxicol Chem* 2015; **34**(2): 275-82.

*Autre étude mettant en évidence les différences d'impact de NPs si les expériences sont réalisées en milieu complexe ou en milieu simplifié.*

### Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent :

- n'avoir aucun conflit d'intérêt  
 avoir un ou plusieurs conflits d'intérêt