

# Toxicité de la cellulose nanométrique : des incertitudes persistent

Ludwig VINCHES et Stéphane HALLE | ludwig.vinches@gmail.com

École de technologie supérieure - Département de génie mécanique – Montréal - Canada

Mots clés : Cytotoxicité, modification chimique, nanocellulose, nanocristaux, nanofibres, protocole de synthèse, toxicité

La nanocellulose est un biopolymère disponible en abondance. En effet, elle est synthétisée à partir de la cellulose contenue dans certains végétaux comme la pulpe des arbres, le coton ou encore le bambou. Elle se compose principalement de 10 à 100 unités répétitives de glucose ayant chacune six groupes hydroxyles (1). Conséquence directe de leurs propriétés physico-chimiques et mécaniques particulières, la nanocellulose cristalline (NCC) et les nanofibres ou nanofibrilles de cellulose (NFC) sont introduites dans la fabrication d'une multitude de produits de consommation courante tels que les produits agroalimentaires (nourriture (2) et emballage des produits (1,3)). Depuis quelques années, des études mettent en avant leurs propriétés antifongiques (4) et antimicrobiennes (5) mais c'est surtout dans le domaine de la santé que les propriétés de la nanocellulose sont exploitées (6,7).

Alors qu'elles étaient sans danger pour la santé et l'environnement (8,9), du fait de leur origine naturelle, des études récentes soulignent cependant un faible risque toxicologique de la NCC et des NFC. Cette veille scientifique rapporte les dernières connaissances sur la toxicité de ces deux formes de nanocellulose. Le premier article présente de récents travaux sur la cytotoxicité des NFC sur des cellules de la peau humaine (fibroblastes et kératinocytes). Il présente aussi un nouveau protocole de synthèse pour obtenir des NFC de grade ultrapur afin de limiter le niveau d'endotoxines. La deuxième publication montre très clairement les limites actuelles rencontrées lors de l'étude de la toxicité de la nanocellulose. En effet, certains paramètres importants ne sont pas encore pris en considération comme la synthèse et l'agglomération de la cellulose nanométrique.

Ces deux publications s'accordent sur une faible toxicité de la NCC et des NFC produites intentionnellement. Mettant en avant des protocoles expérimentaux rigoureux et des méthodes de synthèse novatrices, elles ne concluent pas sur une totale innocuité de la nanocellulose étant donné que les impacts de nombreux facteurs ne sont pas encore connus.

## Produire des nanofibrilles ultrapures et évaluer leur cytotoxicité sur des cellules de peau humaine

Nordli HR. et al. (2016). Producing Ultrapure Nanofibrils and Evaluating the Cytotoxicity Using Human Skin Cells. *Carbohydrate Polymers*, vol. 150 :p65-73

### Résumé

Dans cet article, les auteurs font ressortir deux problématiques importantes. La première est la fabrication de nanofibrilles de cellulose (NFC) ultrapures (< 100 unités d'endotoxine/gramme) permettant de limiter des réponses inflammatoires non désirées et la deuxième est l'évaluation de la toxicité de ces nanofibrilles.

Pour répondre à la première problématique, les auteurs ont développé un protocole de synthèse rigoureux qui leur a permis d'atteindre des taux d'endotoxine de 45 unités par gramme de NFC et allant jusqu'à 2,1 unités par gramme pour la NFC en aérogel.

Après la caractérisation des NFC (microscopie électronique et capacité de rétention d'eau), les NFC ultrapures produites ont été utilisées pour les tests de toxicité. Ces tests ont été menés sur deux types de cellules de la peau humaine (les fibroblastes et les kératinocytes) qui jouent un rôle très important dans le processus de cicatrisation. Après différentes périodes d'incubation (6 et 24 heures), il apparaît une diminution de l'activité métabolique des fibroblastes et une absence de mortalité cellulaire. Pour les kératinocytes, une diminution significative de l'activité métabolique est obser-

vée après une incubation de deux heures. À l'instar des fibroblastes, aucune mortalité cellulaire n'apparaît. Les auteurs ont aussi comparé (par microscopie électronique) la morphologie des cultures de cellules après 24 heures d'incubation avec ou sans NFC. Les différences de morphologie sont significatives. Enfin, ils ont évalué la réponse immunologique. Les réponses varient entre celles obtenues sur fibroblastes ou kératinocytes, et des 27 cytokines mesurées, aucune augmentation n'est observée.

### Commentaire

Afin de minimiser les faux positifs et les résultats erronés, il est important de mener les tests de toxicité avec des nanobjets ultrapurs. Les auteurs ont su développer un protocole de synthèse des NFC innovant et performant. C'est une avancée considérable pour les futures équipes qui travailleront sur la toxicité des NFC. Bien que ce ne soit pas l'objet de cet article, il serait intéressant de valider cette méthode de synthèse, ou du moins s'en inspirer pour obtenir de la nanocellulose cristalline de grade ultrapure.

Les auteurs ont mené leurs essais de toxicité sur des cellules de peau humaine. L'objectif final est de vérifier la non-toxicité des NFC afin de les inclure dans la formulation de pansements. En effet, les NFC ont une capacité de rétention d'eau très importante ce qui est une propriété indispensable dans la conception des pansements. Ces derniers étant aussi souvent en contact avec des cellules sanguines, quelques résultats avec ce type de cellule auraient pu possiblement conforter les conclusions des auteurs quant à l'intégration des NFC dans les pansements. Néanmoins, cette étude pose

des bases très intéressantes pour la synthèse de la nanocellulose ultrapure.

### Impacts de la modification chimique sur la toxicité de différents matériaux de nanocellulose sur le développement du poisson-zèbre

Harper BJ. et al. (2016). Impacts of chemical modification on the toxicity of diverse nanocellulose materials to developing zebrafish. *Cellulose*, vol. 23:p1763

#### Résumé

Les auteurs de cet article ont étudié la toxicité de nanocristaux de cellulose (NCC) et de nanofibres de cellulose (NFC) sur des embryons de poisson-zèbre. Deux paramètres principaux ont été étudiés : la méthode de synthèse des NFC (chimique ou mécanique) et différentes fonctionnalisations des NCC (modifications chimiques) conduisant à des surfaces de charges différentes (anioniques, cationiques ou neutres). Les auteurs ont caractérisé par microscopie électronique les dimensions moyennes des NCC (120 x 9) nm et déterminé le potentiel zêta des NCC.

Les essais de toxicité ont été réalisés à des concentrations d'exposition de 0,2 à 200 mg/L pour les NCC et de 2 à 250 mg/L pour les NFC, pendant une durée d'incubation de 5 jours à 26,8°C.

Dans leurs premiers résultats, les auteurs montrent que les modifications de surface (carboxylée, sulfatée, etc.) des NCC ont une très faible incidence sur leur potentiel toxique vis-à-vis des embryons et de leur développement. Par ailleurs, il semblerait que la provenance des NCC (pâte de bois ou coton) n'a qu'un très léger impact sur la toxicité.

En ce qui concerne les NFC, leur toxicité sur les embryons de poissons-zèbre est également faible. A 250 mg/L, l'un des deux types de NFC fabriquées par homogénéisation mécanique, laisse apparaître une toxicité plus élevée que des NCC synthétisées par voie chimique, suggérant que la méthode d'obtention des NFC peut parfois mais pas systématiquement conduire à un effet toxique plus important.

Dans leurs derniers essais, les auteurs ont mesuré par fluorescence, l'absorption de NCC par les poissons-zèbre. Les résultats montrent que l'absorption de NCC par les embryons débute après trois jours d'exposition et augmente significativement après quatre et cinq jours, suggérant que les NCC fluorescents sont absorbés par voie cutanée puis par voie orale lors des stades ultérieurs de leur développement.

#### Commentaire

Cette étude visait à évaluer le caractère toxique de différents nanocristaux et nanofibres de cellulose sur le développement embryonnaire du poisson-zèbre. Les résultats montrent une faible toxicité des NCC et NFC testés et suggèrent que le facteur de forme élevé de ces nanomatériaux n'est pas un élément prédominant pour prédire leur toxicité. Les auteurs ont également montré que différentes modifications de surface des NCC et NFC, en termes de charges, avaient très peu d'incidence sur le développement et la mortalité des embryons. Pour les NFC, il a été montré que la méthode de synthèse utilisée (chimique ou mécanique) pouvait avoir

une incidence sur la toxicité vis à vis des embryons, sans pour autant que cela soit systématique.

Tout d'abord, il faut noter une très bonne description des différents procédés de synthèse des NCC et des protocoles de modifications chimiques de surface. Afin d'avoir des résultats statistiques en ce qui concerne la caractérisation des NCC par microscopie électronique, un nombre de particules analysées plus important est souhaitable.

Bien que l'étude n'ait pas été menée sur les cellules humaines, les auteurs concluent sur une faible toxicité NCC et NFC. De plus, les résultats sont très intéressants surtout du point de vue de l'absence d'impact des modifications chimiques de surface des NCC sur leur toxicité.

Comme l'indiquent les auteurs, l'agglomération des NCC peut considérablement affecter leurs propriétés toxiques. Les auteurs en ont conscience et une étude plus ciblée sur cette problématique serait très intéressante à envisager.

#### CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces deux articles mettent l'accent sur la toxicité de la NCC et des NFC qui sont principalement utilisées en laboratoire de recherche et produites industriellement au Canada depuis 2012 (1 t/jour).

Au vu de ces deux publications, il apparaît que la toxicité de la NCC et des NFC est faible mais pas totalement nulle. Les essais menés ici sont réalisés soit sur des embryons de poisson, soit sur des cellules de peau humaine et dans les deux situations, l'exposition est par contact sous forme liquide. Cependant, la nanocellulose se retrouve souvent en milieu de travail sous forme aéroportée (en suspension dans l'air), lors de leur manipulation, ce qui complique considérablement leur confinement par rapport à des formes colloïdales liquides.

Comme le souligne le second article, des facteurs comme l'agglomération peuvent jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes conduisant à une augmentation ou une diminution de la toxicité des NCC et NFC.

Il apparaît urgent d'améliorer nos connaissances sur la toxicité de la nanocellulose en prenant en compte des paramètres non étudiés jusqu'à présent et surtout de limiter son utilisation grandissante sans connaître encore parfaitement le potentiel toxique de ces nanobjets. En milieu de travail, des mesures de prévention doivent être mis en place, comme cela est fait pour d'autres nanoparticules, afin de limiter les risques d'exposition des travailleurs manipulant de la nanocellulose.

## GENERAL CONCLUSION

*These articles emphasize the toxicity and cytotoxicity of the NCC and NFC, which are mainly used in research laboratory. But since 2012 they are commercially produced in Canada (production of 1 ton per day).*

*In light of these two publications, it appears that the toxicity of the NCC and the NFC is weak but not totally zero. Although the exposure tests were conducted on fish embryos or cells from human skin (in liquid medium), we often find airborne nanocellulose (in suspension in the air) in workplace which considerably complicates their confinement in relation to forms colloidal liquids.*

*As highlighted in the second article, factors such as the source and nanocellulose synthesis process may significantly alter its toxic nature. Further parameters such as agglomeration can play a key role in the mechanisms leading to an increase or possibly a decrease the toxicity of the NCC and NFC.*

*It appears urgent to improve our knowledge about the toxicity of nanocellulose taking into account non-studied parameters and especially to minimize excessive use without knowing yet the toxic potential of these nano-objects. In workplace, the precautionary principle, as for many other nanoparticles, should be put in place to limit the risk of exposure of workers handling nanocellulose.*

## Lexique

**Fibroblaste** : cellule du tissu conjonctif assurant principalement la souplesse et la cohérence du derme

**Groupe hydroxyle** : fonction chimique comportant un atome d'oxygène et un atome d'hydrogène (-OH)

**Kératinocyte** : cellule composant 90% de la couche superficielle de la peau

**Potentiel zêta** : il caractérise la charge électrique (provenant des ions qui l'entourent) d'une particule lorsque celle-ci est en solution. Il permet ainsi de rendre compte de la stabilité d'une solution de particules.

## Publications de référence

**1 Dhar P, Bhardwaj U, Kumar A**, et al. Cellulose Nanocrystals: A Potential Nanofiller for Food Packaging Applications. *Food additives and packaging* 2014;**1162** :197-239.

**2 Gomez H, Serpa A, Velasquez-Cock J**, et al. Vegetable nanocellulose in food science: A review. *Food Hydrocolloids* 2016;**57**:178-186.

**3 El-Wakil NA, Hassan EA, Abou-Zeid RE**, et al. Development of wheat gluten/nanocellulose/titanium dioxidenanocomposites for active food packaging. *Carbohydrate Polymers* 2015;**124** :337-346.

**4 Robles E, Salaberria AM, Herrera R**, et al. Self-bonded composite films based on cellulose nanofibers and chitin

nanocrystals as antifungal materials. *Carbohydrate Polymers* 2016;**144** :41-49.

**5 Tang J, Song Y, Tanvir S**, et al. Polyrhodanine Coated Cellulose Nanocrystals: A Sustainable Antimicrobial Agent. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2015;**3** :1801-1809.

**6 Lin N et Dufresne A**. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal* 2014;**59** :302-325.

**7 Sunasee R, Hemraz UD et Ckless K**. Cellulose nanocrystals: A versatile nanoplatform for emerging biomedical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2016;

**8 Kovacs T, Naish V, O'Connor B** et al. An ecotoxicological characterization of nanocrystalline cellulose (NCC). *Nanotoxicology* 2010;**4**(3) :255-270.

**9 Shatkin JA et Mram K**. Cellulose nanomaterials: life cycle risk assessment, and environmental health and safety roadmap. *Environmental Science Nano* 2015;**2**:477-499.

**10 Harper B, Sinche F, Ho Wu R** et al. The impact of the surface ligands and synthesis method on the toxicity of glutathione-coated gold nanoparticles. *Nanomaterials* 2014;**4**:355-371.

## Revue de la littérature

**Jebali A, Ardakani AY, Sedighi N**, et al. Cytocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose* 2015;**22** (1):763-778.

**Mertaniemi H, Escobedo-Lucea C, Sanz-Garcia A**, et al. Human stem cell decorated nanocellulose threads for biomedical applications. *Biomaterials* 2016;**82**:208-220.

**Roman M**. Toxicity of Cellulose Nanocrystals: A Review. *Industrial Biotechnology* 2015;**11** (1):25-33.

**Du L, Arnholt K, Ripp S**, et al. Biological toxicity of cellulose nanocrystals (CNCs) against the luxCDABE-based bioluminescent bioreporter Escherichia coli 652T7. *Ecotoxicology* 2015;**24**(10):2049-2053.

## Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt