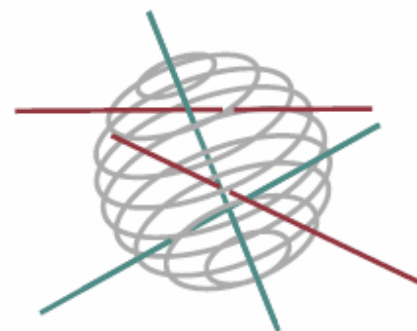


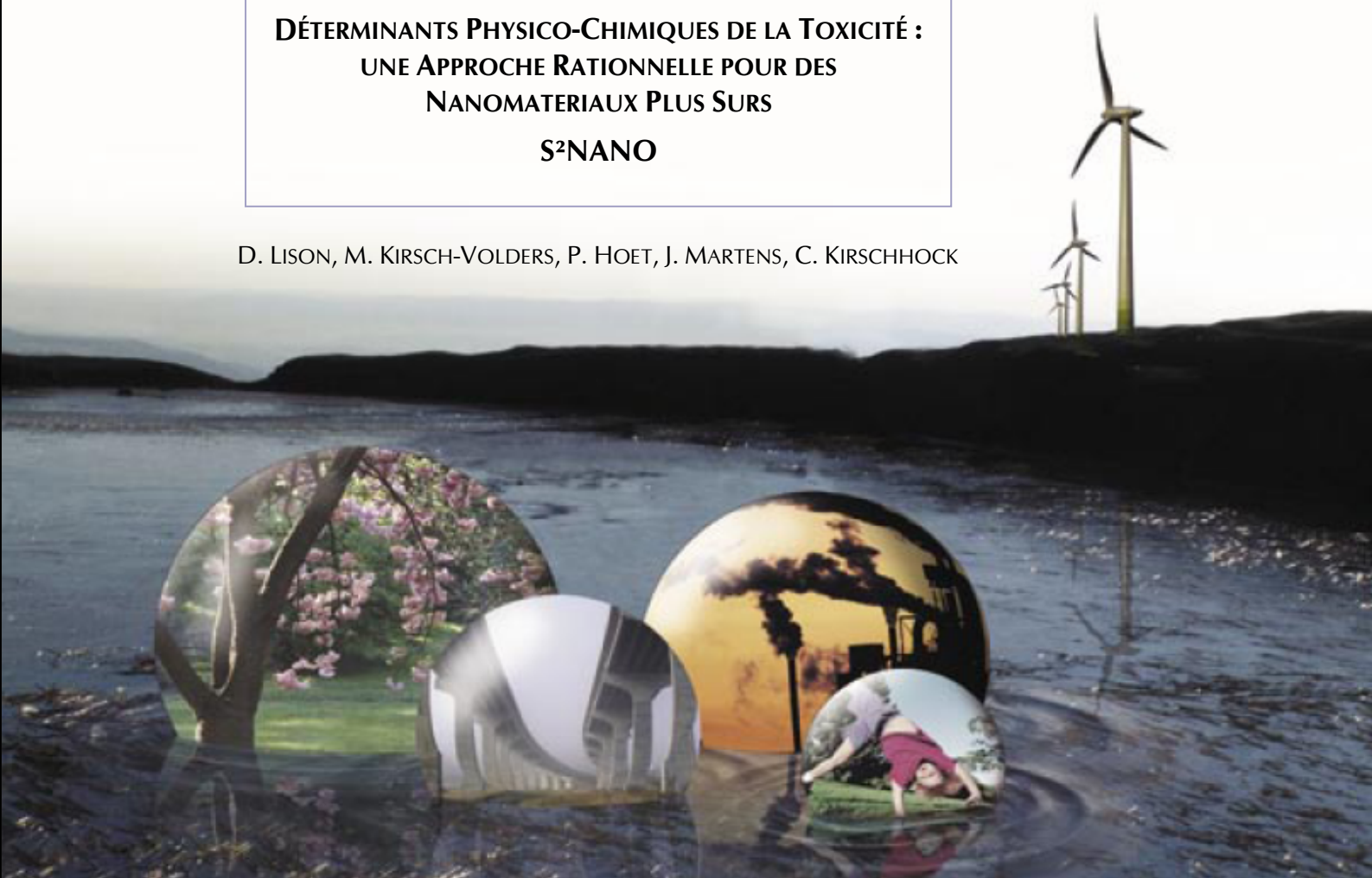
SSD

SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT



**DÉTERMINANTS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA TOXICITÉ :
UNE APPROCHE RATIONNELLE POUR DES
NANOMATERIAUX PLUS SURS
S²NANO**

D. LISON, M. KIRSCH-VOLDERS, P. HOET, J. MARTENS, C. KIRSCHHOCK



ENERGY 

TRANSPORT AND MOBILITY 

AGRO-FOOD 

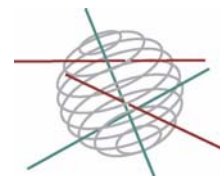
HEALTH AND ENVIRONMENT 

CLIMATE 

BIODIVERSITY 

ATMOSPHERE AND TERRESTRIAL AND MARINE ECOSYSTEMS 

TRANSVERSAL ACTIONS 



Santé & Environnement



RAPPORT FINAL PHASE 1
RESUME

**DÉTERMINANTS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA TOXICITÉ :
UNE APPROCHE RATIONNELLE POUR DES NANOMATERIAUX
PLUS SURS**

S²NANO

Promoteurs

D. LISON

Université Catholique de Louvain (UCL)
Industrial Toxicology and Occupational Medicine unit (TOXI)
Avenue Mounier, 53.02 - 1200 Brussels
dominique.lison@uclouvain.be

M. KIRSCH-VOLDERS

Vrije Universiteit Brussel (VUB)
Laboratory of Cell Genetics (CEGE)
Pleinlaan, 2 - 1050 Brussels
mkirschv@vub.ac.be

P. HOET

Katholieke Universiteit Leuven (KULeuven)
Laboratory of Lung Toxicology (LUNG)
O&N I Herestraat 49 - bus 00706 - 3000 Leuven
peter.hoet@med.kuleuven.be

J. MARTENS – C. KIRSCHHOEK

Katholieke Universiteit Leuven (KULeuven)
Centrum voor Oppervlaktechemie & Katalyse (COK)
Kasteelpark Arenberg 23 - bus 02461 - 3001 Heverlee
johan.martens@biw.kuleuven.be

Auteurs

D. Lison - UCL
M. Kirsch-Volders - VUB
P. Hoet – (KULeuven – LUNG)
J. Martens, C. Kirschhock - (KULeuven – COK)

Janvier 2009



BELGIAN SCIENCE POLICY



Rue de la Science 8
Wetenschapsstraat 8
B-1000 Brussels
Belgium
Tel: +32 (0)2 238 34 11 – Fax: +32 (0)2 230 59 12
<http://www.belspo.be>

Contact person: Emmanuèle Bourgeois
+32 (0)2 238 34 94

Neither the Belgian Science Policy nor any person acting on behalf of the Belgian Science Policy is responsible for the use which might be made of the following information. The authors are responsible for the content.

No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without indicating the reference :

D. Lison, M. Kirsch-Volders, P. Hoet, J. Martens, C. Kirschhock. ***“Déterminants physico-chimiques de la toxicité :une approche rationnelle pour des nanomatériaux plus sûrs - S²NANO”***. Rapport Final Phase 1 Résumé. Bruxelles : Politique scientifique fédérale 2009 – 6 p. (Programme de recherche « La science pour un Développement Durable »)

A. Contexte

Les nanomatériaux ont actuellement envahi presque tous les domaines industriels et se retrouvent déjà dans de nombreux articles de consommation. Leur production et commercialisation vont s'accroître encore au cours des prochaines années. Au cours de ces activités, les travailleurs, les consommateurs et le public au sens large sont potentiellement exposés à ces nanomatériaux. La question d'un impact possible sur la santé se pose donc de manière évidente. En effet, les mêmes propriétés physico-chimiques qui rendent les nanomatériaux tellement attractifs d'un point de vue technologique pourraient constituer un danger pour la santé humaine. En particulier, la grande réactivité physico-chimique des nanomatériaux est susceptible de s'exercer également à l'endroit des tissus biologiques avec lesquels les nanoparticules entreraient en contact. Une évaluation des propriétés toxicologiques des nanomatériaux est donc urgemment nécessaire. Les données fragmentaires disponibles confirment ces craintes, et l'on sait actuellement que les nanoparticules exercent des effets toxiques au niveau des voies respiratoires, mais probablement aussi au niveau cardio-vasculaire et du système nerveux central.

Devant la très grande diversité de nanoparticules, existantes et à venir, la tâche de déterminer les dangers pour la santé pour chacune de ces substances se révèle immense, et probablement démesurée par rapport aux moyens disponibles. Il est donc nécessaire de développer des approches plus génériques basées, notamment, sur la connaissance des propriétés des nanoparticules qui en déterminent l'activité toxique.

B. Objectifs

L'objectif du programme S²NANO est de comprendre comment les nanoparticules exercent leurs effets toxiques, et d'en identifier les déterminants physico-chimiques.

Cette approche contribue à :

- une meilleure connaissance des mécanismes influençant les interactions des nanomatériaux avec les cellules et les tissus biologiques,
- améliorer l'approche métrologique des nanoparticules, sur base de paramètres plus pertinents que la dose massique, comme par exemple la surface ou le nombre de particules ou leur morphologie.

Ce programme fournira des bases scientifiques solides pour permettre le développement durable des nanomatériaux et pour transmettre aux acteurs réglementaires ainsi qu'aux industriels des recommandations basées sur les preuves pour la production, et la maîtrise de matériaux plus sûrs. Il aborde exclusivement les aspects de santé humaine, il ne s'adresse pas aux aspects écotoxicologiques.

Le modèle expérimental sélectionné pour réaliser la recherche repose sur les nanoparticules de silice (SNP). Les raisons de ce choix sont multiples et comprennent notamment :

- la possibilité de synthétiser de manière relativement aisée une large gamme de SNP en faisant varier une propriété à la fois,
- la grande pureté avec laquelle de telles SNP peuvent être générées,
- l'insolubilité des SNP qui permet d'étudier l'effet des nanoparticules *per se* en excluant l'impact des éléments ou molécules qui pourraient être solubilisés dans les milieux biologiques,
- la possibilité de doser aisément le silicium dans les milieux biologiques exposés à ces SNP, comme marqueur de la dose au niveau de la cible biologique,
- le partenaire responsable de la préparation des SNP possède une grande expérience de ces nanomatériaux.

C. Conclusions

Au cours des 2 premières années du projet (phase I), les équipes de recherche ont mis en place une réelle approche multidisciplinaire qui a permis un dialogue et un enrichissement réciproque entre les biologistes et les chimistes participant au réseau.

Les outils permettant de réaliser la recherche ont d'abord été mis en place; des SNP ont été synthétisées et préparées avec soin et des modèles cellulaires ont été développés pour étudier l'effet de ces SNP.

Une série unique de 17 SNP monodispersées a été synthétisée en faisant varier la taille, la surface et/ou la porosité de nanoparticules (Tableau 1).

Ensuite, afin de pouvoir étudier les effets biologiques de ces SNP individuelles et d'éviter la formation d'agrégats, un effort particulier a été réalisé pour obtenir une formulation qui permette de maintenir une suspension de SNP individuelles en milieu aqueux, y compris dans le milieu de culture cellulaire. Certaines SNP ont également été préparées dans des conditions garantissant la quasi absence d'endotoxines afin de permettre d'étudier l'impact de ces SNP sur des processus immunologiques délicats et très sensibles à ce type de contamination. Ces préparations ont été caractérisées très soigneusement et ce travail a fait l'objet d'une première publication scientifique (Thomassen *et al.* 2009).

Des modèles cellulaires ont été développés pour étudier *in vitro* :

- les effets génotoxiques sur une lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines,
- les effets sur une lignée de cellules endothéliales humaines et l'impact sur la coagulation,
- l'activation d'une lignée de macrophages et la production de médiateurs inflammatoires.

Avant de mettre en œuvre ces modèles cellulaires, il était nécessaire d'ajuster des problèmes de dosimétrie des SNP et de vérifier quelle fraction de la dose mise en œuvre était biologiquement active. Nous avons pu montrer que la dose nominale (toutes les SNP présentes dans le milieu de culture) rendait compte de leur activité cytotoxique sur les 3 lignées cellulaires utilisées comme modèle. Ces données ont fait l'objet d'une deuxième publication (Lison *et al.* 2008).

Ensuite, avant d'aborder des phénomènes cellulaires plus complexes, nous avons étudié l'activité cytotoxique des SNP vis-à-vis des 3 lignées cellulaires-cibles. Les SNP les plus petites se sont révélées les plus cytotoxiques, et la surface de particules (plutôt que la masse) apparaissait comme le paramètre rendant le mieux compte de l'activité cytotoxique des SNP. Ces données ont également fait l'objet d'une publication (Napierska *et al.* 2009). Des travaux supplémentaires ont montré que les déterminants physico-chimiques de la cytotoxicité variaient selon la lignée cellulaire étudiée et qu'il apparaissait donc peu probable qu'une seule caractéristique des SNP puisse rendre compte de leur cytotoxicité. Une observation particulièrement intéressante concerne l'impact protecteur que semble avoir la microporosité des SNP dans la lignée de macrophages, mais pas dans les autres lignées.

Pour étudier l'activité génotoxique des SNP, il était nécessaire de respecter un certain nombre de critères de qualité garantissant la validité scientifique des données obtenues. A cette fin, une revue critique de la littérature a été réalisée afin de dégager les aspects importants à prendre en compte en nanogénotoxicologie. Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique (Gonzalez *et al.* 2008). Parmi d'autres l'interaction possible des nanoparticules avec les tests de génotoxicité doit être envisagée. Dans ce contexte, l'interaction des SNP avec la glycosylase dans le test du comet et de la cytochalasin-B avec l'internalisation des SNP dans le test du micronoyau a été étudié. Les résultats des études de génotoxicité

indiquent que les SNP induisent des effets clastogènes et aneugènes ; ces effets sont plus marqués avec les plus petites SNP. Des données obtenues durant cette première phase suggèrent également que les SNP agissent via une interférence avec les microtubules cellulaires.

D. Apport du projet dans un contexte d'appui scientifique à une politique de développement durable

Une prise en compte précoce des impacts possibles des nanotechnologies sur l'environnement et la santé humaine est indispensable pour garantir le développement durable de ce nouveau champ d'activité économique, et éviter des catastrophes telles que l'on a pu en connaître récemment, par exemple dans le dossier des organismes génétiquement modifiés.

Dans l'esprit d'un développement durable, l'acceptation des nouveaux nanomatériaux par le public dépendra en effet largement de la capacité d'intégrer les aspects (éco)toxicologiques dès les premières phases du développement industriel. Le projet S²NANO permet d'anticiper les problématiques toxicologiques, et possède donc une valeur socio-économique majeure.

E. Mots-clés

Nanomatériaux – Nanoparticules – Nanotoxicologie – Nanogénotoxicologie

Tableau 1 : Echantillons préparés dans le cadre de la phase I du programme S²NANO

échantillon	nom	type	Structure	concentration (mg/ml)	diamètre hydrodynamique (DLS) dans le DMEM (nm)**	diamètre ME (nm)	surface externe calculée (ME)*** (m ² /g)	surface BET (m ² /g)	external surface area alphas (m ² /g)	micropore volume alphas (µl/g)
S1	*	Stober	Amorphe	3,69	38,09	29,3	102			
S2	S-16	Stober	Amorphe	3,24	25	16,4	183	220	183	22
S3	S-19	Stober	Amorphe	2,54	26	19,4	155	139	145	34
S4	S-60	Stober	Amorphe	4,63	75	60,4	50	42,1	33	0
S5	S-74	Stober	Amorphe	44,66	104	74,5	40	167	57	71
S6	S-104	Stober	Amorphe	5,13	139	104	29	41,2	28	2
S7	S-335	Stober	Amorphe	3,96	566	335	9	16,4	8	3
HS	L-15	Ludox	Amorphe	124,36	22	14,7	204	255	179	0
LS	L-14	Ludox	Amorphe	134,39	22	13,8	217	275	196	0
SM	L-10*	Ludox	Amorphe	167,82	63	10,3	291	343	250	0
SM2	L-11	Ludox	Amorphe	44,48	21	11,0	273	241	179	0
F1	Lys-2	Lysine	Amorphe	11,12	12	2,1	1429	325	232	2
F2	Lys-26	Lysine	Amorphe	2,09	28	25,7	117	141	121	0
F3	Lys-34	Lysine	Amorphe	5,79	38	33,6	89	80	71	0
F4	Lys-36	Lysine	Amorphe	10,59	40	35,7	84	89,4	73	0
S10	S-25	Stober	Amorphe	1,09	30,39	18,1	166	279	206	3
S11	S-22	Stober	Amorphe	0,84	33,28	15,1	199	385	244	33
S12	S-28	Stober	Amorphe	3,32	36,61	16,7	179	422	261	40

* agrégats ~90 nm

** : @ J 1

*** : sphère parfaitement ronde