



Ecole thématique 2025

Synopsis

Toxicité / écotoxicité / nouvelles approches méthodologiques

Cours 1 : Toxicologie des nanomatériaux

Francelyne MARANO, Université Paris Cité (francelyne.marano@paris7.jussieu.fr)

La question de la toxicité des nanoparticules manufacturées a été posée au début du 21^{ème} siècle en se basant sur les connaissances acquises sur l'impact des particules fines et ultrafines de l'atmosphère en particulier les particules Diesel. Depuis la communauté des toxicologues s'est fortement mobilisée pour mieux comprendre les interactions qui peuvent exister entre les nanoparticules et le vivant et a créé le concept de nanotoxicologie (1,2). Si les études épidémiologiques manquent encore sur l'exposition professionnelle ou environnementale, de très nombreuses études expérimentales ont été publiées, en particulier sur les nanoparticules les plus utilisées : NP de TiO₂, de ZnO, d'Ag, de silice colloïdale, de CeO...

1. Propriétés des NM et toxicité :

La toxicité des nanoparticules est liée à l'augmentation de la surface spécifique, donc du nombre d'atomes en surface des particules, ce qui favorise les interactions avec les molécules biologiques. Celles-ci peuvent former une couronne autour des particules (la corona) qui facilite les interactions avec les membranes cellulaires et le passage des barrières biologiques. Par ailleurs, pour une masse constante, plus la taille des particules diminue, plus leur nombre augmente, de sorte que la question de la quantification de l'exposition, en masse, en nombre, voire en surface de particules, se pose de manière cruciale. D'autres facteurs importants à prendre en compte sont la solubilité des particules et leur capacité à former des agglomérats.

2. Les voies d'exposition aux NM

L'exposition aux nanoparticules se fait par la voie respiratoire, en particulier pour les travailleurs qui peuvent être exposés à des poudres au cours de manipulations pendant les processus de production, de transformation et d'épandage pour les agriculteurs. Pour les consommateurs, l'exposition se fait également par la peau, en particulier pour les produits cosmétiques et d'hygiène corporelle. Enfin elle se produit, *via* l'alimentation, par l'appareil digestif, de nombreux aliments transformés contenant des additifs nano particuliers. Les capacités d'interaction des nanoparticules avec les fluides biologiques – mucus, surfactant et protéines du sérum étudiées *in vitro* permettent de mieux comprendre leurs propriétés de passage des barrières biologiques – alvéolocapillaire, intestinale, hémato-encéphalique et, éventuellement, placentaire. Les propriétés de surface des nanoparticules jouent un rôle essentiel dans ces passages. Un autre facteur important, qui aura sûrement une valeur décisive dans les calculs d'analyse de risque pour la santé, est celui de l'accumulation de nanoparticules dans des organes cibles et de leur bio persistance, même si ce passage et cette accumulation sont très faibles.

3. Les mécanismes de toxicité

Les mécanismes de toxicité ont été mis en évidence à partir d'études expérimentales chez le rongeur ou *in vitro* sur des modèles d'épithélium respiratoire, cutané et intestinal souvent d'origine humaine. Les nanoparticules et les nanotubes peuvent induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui,



Ecole thématique 2025

Synopsis

Toxicité / écotoxicité / nouvelles approches méthodologiques

selon leur niveau de production et la balance biologique oxydant/ antioxydant, sont à l'origine d'une réponse inflammatoire tissulaire voire systémique. Elles peuvent aussi être génotoxiques en induisant des altérations de l'ADN ou des modifications épigénétiques. Enfin, elles peuvent être immunotoxiques. Ces mécanismes de toxicité, associés à une exposition chronique à des nanoparticules dont certaines sont persistantes et capables de s'accumuler dans des organes internes, peuvent entraîner des pathologies telles que des cancers et des maladies neurodégénératives.

(1) Les nanosciences 4. Nanotoxicologie et nanoéthique, sous la direction de M.Lahmani, F.Marano et P.Houdy Ed Belin 2010, 607p

(2) W. Yang, Li. Wang, E. M. Mettenbrink, P. L. DeAngelis, and S. Wilhelm, Nanoparticle Toxicology, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2021. 61:269–89



Ecole thématique 2025

Synopsis

Toxicité / écotoxicité / nouvelles approches méthodologiques

Cours 2 : Méthodes de mesure de la toxicité des nanomatériaux

Francelyne MARANO, Université Paris Cité (francelyne.marano@paris7.jussieu.fr)

Avant toute expérimentation, il est nécessaire de considérer de façon générale, les étapes clés suivantes pour permettre une évaluation rigoureuse de la toxicité de NMs :

- la caractérisation physico-chimique initiale du NM étudié est un socle indispensable prélude à toute expérimentation quelle qu'elle soit,
- la méthode de préparation (protocole de dispersion) puisque la nature du dispersant utilisé et la méthodologie suivie influencent directement la qualité et la représentativité de la suspension, ainsi que le contrôle de l'homogénéité et de la stabilité des suspensions nano particulières,
- le choix du système d'essai mis en œuvre (type cellulaire et conditions de culture associées, espèce animale) en relation avec la cible recherchée (endpoint)

A. Les études toxicologiques se font :

1. par expositions d'animaux de laboratoire, essentiellement des rats et des souris.

La voie pulmonaire est explorée par instillation intra-trachéale, par inhalation dans des chambres d'inhalation ou par l'inhalation nasale. Des lavages broncho-alvéolaires permettent de suivre des marqueurs de stress oxydant et de l'inflammation (cytokines, lymphocytes, macrophages).

La voie digestive s'étudie après exposition via l'alimentation suivie de prélèvements d'organes ou de tissus (intestin) et recherche de marqueurs de l'inflammation et de la réponse immunitaire. L'impact sur le microbiote est aussi recherché. Enfin, même si **pour les produits cosmétiques** la toxicologie *in vivo* est interdite, les nanoparticules sont testées chez l'animal quand il est nécessaire d'évaluer des effets chroniques. Les passages de barrières se font après exposition à des nanoparticules marquées.

2. **par exposition à des cultures de cellules ou de tissus, dont souvent d'origine humaine**, provenant des différents organes considérés comme étant des cibles potentielles. Différentes lignées cellulaires sont utilisées. Pour les épithéliums respiratoires et intestinaux, les chambres de culture à deux compartiments permettent d'établir *in vitro* la polarité des tissus et sont bien adaptée à l'étude du passage de barrière. La toxicologie cutanée utilise des modèles d'épiderme humain en culture et des explants provenant de chirurgie.

B. Les tests toxicologiques.

Les protocoles d'étude chez l'animal doivent respecter la règle des 3R (Replace, Reduce, Refine) imposée par des directives européennes. Ils doivent être évalués par le comité d'éthique animale de l'université ou de l'institut de recherche. Les tests réglementaires se font selon les guidelines de l'OCDE. Cependant



Ecole thématique 2025

Synopsis

Toxicité / écotoxicité / nouvelles approches méthodologiques

les tests réglementaires classiques ne sont pas adaptés aux nanomatériaux de sorte que l'OCDE a créé des groupes de travail pour adapter les lignes directrices aux NM

Les tests *in vitro* sont très variés, ils vont de la simple mesure de cytotoxicité (test rouge neutre, MTT) ou de stress oxydant à l'analyse des mécanismes d'endocytose, l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation, des mesures de transcriptome, de protéome et de métabolome.

Les tests de génotoxicité sont demandés aux industriels selon les guidelines OCDE : pour l'étude du potentiel mutagène, les tests de mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifères, le test du micronoyau *in vitro* pour les effets clastogènes. Le test des comètes *in vitro* est recommandé bien que ne possédant pas de guidelines.

En conclusion, l'étude de la toxicité des nanomatériaux est difficile car de nombreux biais expérimentaux liés à leurs propriétés particulières peuvent entraîner des erreurs d'interprétation. Il est important d'avoir un regard critique sur les publications, en particulier celles qui utilisent des approches *in vitro*.

<https://www.ciel.org/wp-content/uploads/2016/08/OECD-update-nov2015-FRENCH-7.22.pdf>

Toxicité / écotoxicité / nouvelles approches méthodologiques

Cours 3 : Ecotoxicité des nanomatériaux

Catherine SANTAELLA, LEMIRE, Aix-Marseille (catherine.santaella@cea.fr)

Emmanuel FLAHAUT, CIRIMAT, Toulouse (emmanuel.flahaut@utoulouse.fr)

Dans le contexte de l'approche "une seule santé" il est important de considérer que l'impact des nanomatériaux sur l'environnement n'est pas sans conséquences sur la santé humaine. Les échelles de temps sont souvent beaucoup plus longues du fait de la dilution des contaminants dans l'environnement et du temps nécessaire pour remonter jusqu'à l'homme, le plus souvent par la voie alimentaire.

Après avoir présenté les principaux types d'écosystèmes (terrestres, aquatiques et aériens) ainsi que leurs modes d'interactions possibles avec les nanomatériaux manufacturés, nous mettrons en lumière la transition méthodologique vers des approches de plus en plus intégratives et réalistes. Cette évolution s'appuie sur la complémentarité des disciplines scientifiques afin d'appréhender les effets des nanomatériaux à toutes les échelles et dans une grande variété de contextes d'exposition, tout en poursuivant l'amélioration des méthodes et le partage des connaissances pour combler les lacunes qui subsistent.

Dans un second temps, nous illustrerons par des exemples issus de nos travaux de recherche dans le domaine des nanomatériaux carbonés comment leur dimensionnalité (0D, 1D, 2D) ou encore leur chimie de surface influence de manière très directe leur impact sur différents modèles terrestres (plantes), aériens (pollens) ou aquatiques (amphibiens). Nous présenterons aussi dans le cas des oxydes de graphène comment une approche safe(r) by design peut permettre de concilier une utilisation sûre de l'oxyde de graphène par réduction contrôlée et modérée, tout en supprimant sa toxicité.

MESOCOSMS

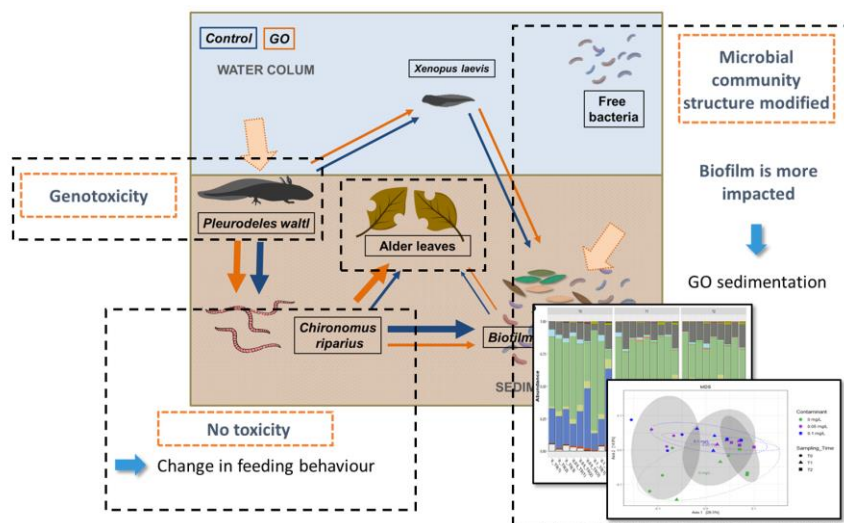


Illustration de l'utilisation de mésocosmes combinant différentes espèces évoluant dans différents compartiments environnementaux (colonne d'eau, sédiment) et impliquées dans des chaînes trophiques (cas de l'oxyde de graphène, Evariste et al., Carbon 156 (2020) 261-271).



Ecole thématique 2025

Synopsis

Toxicité / écotoxicité / nouvelles approches méthodologiques

Cours 4 : Nouvelles Approches Méthodologiques

Marie CARRIERE, CEA Grenoble (marie.carriere@cea.fr)



Ecole thématique 2025

Synopsis

Toxicité / écotoxicité / nouvelles approches méthodologiques

Cours 5 : Nanotechnologies et Santé au Travail

Patrick BROCHARD, Université Bordeaux , unité INSERM 1219 (patrick.brochard@u-bordeaux.fr)

L'émergence des nanotechnologies dans le monde du travail depuis le début des années 2000 représente un enjeu majeur et potentiellement difficilement compatible entre des intérêts industriels et des craintes sanitaires.

Dans ce domaine en effet, la multiplication des publications concernant **les effets biologiques des particules de matière en rapport avec leur taille nanométrique** (par comparaison avec des particules de même composition, mais de taille micrométrique) doit alerter sur d'éventuelles conséquences sanitaires chez les travailleurs qui y sont exposés. Même si l'extrapolation à l'homme des données obtenues avec des modèles expérimentaux in vitro et in vivo est très discutée, aucune donnée clinique ou épidémiologique ne permet de trancher à ce jour. Mais cette absence de données ne permet pas encore d'éliminer d'éventuels risques à long temps de latence (cancers, pathologies dégénératives) compte tenu du faible temps écoulé depuis la mise en place progressive des nanotechnologies. De plus, ces études restent très complexes à réaliser comme l'a montré l'échec du projet Epinano de surveillance épidémiologique des travailleurs exposés que Santé Publique France avait été chargé de mettre en place dès 2008. Par ailleurs les mécanismes physio-pathogéniques communs évoqués dans le domaine des particules nanométriques qu'elles soient manufacturées ou non intentionnelles soulignent l'intérêt des études épidémiologiques en rapport avec les expositions aux particules nanométriques non intentionnelles (appelées couramment particules ultrafines) qui montrent des effets à moyen et long terme associés à ces expositions (environnementales et professionnelles).

Une autre limite importante de la surveillance des populations de travailleurs concernés réside dans les **difficultés rencontrées pour caractériser leurs expositions** : si les méthodes de mesure sont maintenant disponibles, leur mise en œuvre reste techniquement difficile. De plus, si le repérage des expositions est aisé dans les unités de recherche (laboratoires académiques ou unité de recherche et développement de l'industrie chimique) et dans les entreprises industrielles qui fabriquent, importent ou diffusent ces nano-objets (déclaration obligatoire en France depuis 2013 dans le cadre du programme Rnano), il est beaucoup plus difficile, malgré les évolutions réglementaires européennes et française, de réaliser une traçabilité satisfaisante des travailleurs exposés dans des entreprises utilisatrices d'articles, matériaux et produits contenant des nano-objets (maintenance, transformation, recyclage et destruction) qui sont de plus en plus nombreuses (bâtiment, transport, textile, alimentation, imprimerie, électronique, composites, cosmétiques, ..., sans oublier la santé). Or les procédés de travail qui y sont mis en œuvre sont susceptibles de générer des aérosols de particules nanométriques plus ou moins transformées. La méconnaissance des expositions qui en résultent conduit à des stratégies de prévention non adaptées, et ne permet pas de connaître les effectifs réels de travailleurs concernés en France.



Ecole thématique 2025

Synopsis

Toxicité / écotoxicité / nouvelles approches méthodologiques

Tous ces éléments justifient la mise en place du **principe de précaution** comme le Comité Prévention Précaution du ministère de l'environnement l'avait recommandé en France dès 2006. Ainsi, la vigilance des équipes de santé au travail doit être renforcée pour optimiser les démarches d'évaluation de risque et de prévention médicale collective et individuelles (traçabilité, métrologie et biométrologie, suivi médical), en complément des interventions prioritaires des préventeurs chargés de la mise en place des stratégies de prévention primaire.

En conclusion, il existe encore aujourd'hui un décalage croissant entre les données toxicologiques et épidémiologiques disponibles, la mise en place de programme de prévention adaptée et le développement exponentiel des nanotechnologies et leurs applications dans des secteurs de plus en plus variés, partout dans le monde.