

SIGNANOTOX : recherche de signatures toxicologiques de l'exposition, in vitro, à des nanoparticules

Mary-Line Jugan¹, Nathalie Herlin-Boime², Martine Mayne-L'Hermitte², Danielle Jaillard³, Stéphane Roux⁴, Sébastien Leuillet⁵, Thierry Douki⁶ et Marie Carrière^{1,6}

¹UMR3299 CEA-CNRS, Service Interdisciplinaire des Systèmes Moléculaires et Matériaux, Laboratoire Structure et Dynamique par Résonance Magnétique, CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette Cedex. maryjugan@yahoo.fr

²URA2453 CEA-CNRS, Service des Photons, Atomes et Molécules, Laboratoire Francis Perrin (LFP), CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette Cedex. nathalie.herlin@cea.fr, martine.mayne@cea.fr

³CNPS UMR 8195, CCME Bât 440 bis, Université Paris-Sud XI, 91 405 Orsay Cedex. danielle.jaillard@u-psud.fr

⁴UMR CNRS 6213, Université de Franche-Comté, équipe "Nanosciences, Membranes et Capteurs", Bâtiment N, bureau -114, 16, route de Gray, La Bouloie, 25030 Besançon. stephane.roux@univ-fcomte.fr

⁵Centre International de Toxicologie (CIT), BP563, 27005 Evreux Cedex. sebastien.leuillet@citox.fr

⁶CEA, INAC, SCIB, UJF & CNRS, LCIB (UMR_E 3 CEA-UJF and FRE 3200), Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9. thierry.douki@cea.fr, marie.carriere@cea.fr

Objectifs, situation du sujet

Les nanoparticules (NP) sont introduites dans de nombreux produits de la vie courante avec lesquels nous sommes en contact direct (cosmétiques, peintures, produits et emballages alimentaires...) alors que leur innocuité n'est pas scientifiquement démontrée. Le Woodrow Wilson Institute, dans le cadre du projet Nanotech, dresse un inventaire en temps réel des NP introduites dans des produits de consommation, qui est consultable sur la page web <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>. Parmi ces produits de grande consommation, il est important de noter que la plupart d'entre eux entrent dans la catégorie « produits de santé et de fitness », que 17% d'entre eux contiennent un nano-composant à base de carbone et que plus de 10% d'entre eux contiennent du dioxyde de titane (TiO₂) à l'état nanoparticulaire [1]. Selon un rapport de l'AFSSET paru en 2008 [2], la production mondiale de NP-TiO₂ atteignait 2 millions de tonnes par an, la production de NP à base de carbone atteignait 10 millions de tonnes par an. L'argent (Ag), l'alumine (Al₂O₃) et la silice (SiO₂) étaient également parmi les NP les plus produites dans le monde. Il est donc essentiel d'évaluer le danger associé à l'utilisation de ces NP, et en particulier les effets toxiques qu'ils pourraient induire à la fois sur la population et sur les travailleurs qui sont potentiellement exposés quotidiennement à ces substances. Il est également important d'identifier des biomarqueurs de l'exposition à ces NP, qui permettraient de suivre les populations et les travailleurs et d'évaluer le risque d'apparition d'effets à long terme sur leur santé.

En cas d'exposition à des NP, il est reconnu que les organes cibles sur lesquels les effets toxiques pourraient apparaître sont le poumon, la peau, les organes du système gastro-intestinal, qui sont directement exposés aux NP qui seraient inhalées (par exemple par les travailleurs dans les usines de production), déposées sur la peau (par exemple lors de l'emploi de cosmétiques contenant des NP) ou ingérées (par exemple lors de la consommation de produits alimentaires contenant des NP ou ayant été au contact d'emballages contenant des NP et en ayant libéré dans l'aliment). Des organes cibles secondaires ont également été identifiés, ces derniers sont exposés si les NP s'avèrent traverser les barrières physiologiques. Ces organes cibles secondaires sont le foie, les reins et le cerveau.

Dans ce cadre l'objectif du projet SIGNANOTOX était d'évaluer l'impact d'un panel de NP sur ces différents organes cibles et de rechercher des signatures toxicologiques de l'exposition aux NP, qui pourraient être des marqueurs précoces ou a posteriori de l'exposition des travailleurs ou de la population. Une approche *in vitro* a été employée, consistant à exposer des lignées cellulaires de poumon (A549), de foie (Hep-G2) et de rein (NRK-52^E et HK-2) à un panel de NP choisies parmi les plus produites dans le monde (oxydes métalliques : TiO₂, SiO₂, Gd₂O₃ ; nanotubes de carbone multi-feuillets (NTC) ; carbures de silicium (SiC) ; or ; argent ; silicium). Dans le cas des NP-TiO₂, des NP-SiC et des NTC, un des objectifs du projet était également d'évaluer l'influence des caractéristiques physico-chimiques sur les effets biologiques observés. Des NP-TiO₂ présentant différents diamètres,

formes et phase cristalline ont ainsi été testées. Un panel de NP-SiC présentant des diamètres et des ratios Si/C variables a été synthétisé et testé. Des NP d'or de diamètre variable ont également été testées. De même des NTC présentant une distribution de longueur et une pureté variables ont été testés. Une batterie de tests a été mise en œuvre, dans le but de caractériser l'accumulation et la répartition cellulaire de ces NP, leurs effets cytotoxiques, génotoxiques et pro-oxydants, pour finalement identifier un profil de réponse cellulaire commun à toutes ces NP.

Matériels et méthodes

Les lignées cellulaires utilisées, A549, Hep-G2, NRK-52^E et HK-2 ont été exposées à des NP et NTC d'origine commerciale ou produits dans les laboratoires de N. Herlin, M. Mayne et S. Roux, partenaires du projet. L'accumulation et la répartition cellulaire des NP ont été identifiées par microscopie électronique à transmission (MET) dans le laboratoire de D. Jaillard. Les tests de cytotoxicité utilisés sont les tests MTT, XTT, LDH, rouge neutre, sulforhodamine B, le test de survie clonogénique et la coloration au bleu trypan [3, 4] (laboratoire de M. Carrière). Pour évaluer la génotoxicité, le test des comètes dans sa version alcaline a été mis en œuvre, permettant de quantifier les cassures de l'ADN (simple brin, double brin et sites alcali-labiles) (laboratoires de T. Douki et M. Carrière). Les lésions oxydatives de l'ADN ont été mesurées par HPLC-MS/MS dans le laboratoire de T. Douki. D'autre part l'immunomarquage des foci de γ -H2AX a été utilisé, permettant de mettre en évidence la présence de cassures double brin. Enfin le test des micronoyaux a permis d'évaluer la présence de cassures ou pertes de chromosomes (effets aneugènes et clastogènes, laboratoire de M. Carrière). Les effets pro-oxydants des NP ont été mis en évidence par le dosage intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et du glutathion, dans sa forme oxydée et dans sa forme réduite. D'autre part les effets des NP sur les enzymes responsable du maintien de la balance redox cellulaire a été évalué : catalase, superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réductase (GR) (laboratoire de M. Carrière). Une approche globale, par transcriptomique (puces Affymetrix), a finalement été appliquée pour comparer les modulations dans l'expression des gènes i) d'un même type cellulaire, exposé aux différentes NP et ii) des différents types cellulaires, exposées aux NP les plus réactives (responsable de ces expériences : P. Ancian).

Il est important de noter que ce travail a été mené avec des NP brutes, dans l'état de dispersion optimal. Ainsi les dispersions de NP d'oxydes métalliques ont été préparées dans de l'eau par sonication à haute puissance (N. Herlin), puis diluées dans des milieux de culture cellulaire ne contenant pas de sérum (donc peu de protéines). Par conséquent les suspensions de NP sont légèrement agglomérées, le diamètre moyen des agglomérats atteignant 300 à 400 nm [4]. Les NP-SiC ont été mises en suspension dans du sérum de veau fœtal. Les NP d'or ont été mises en suspension directement dans les milieux de culture, mais ont auparavant été stabilisées avec une solution de citrate ou recouvertes de DTDTPA. Dans le cas des NTC un surfactant a été utilisé, la gomme arabique, car du fait de leur hydrophobicité ces derniers restaient à l'état aggloméré lors de leur préparation. Ainsi préparés, les NTC sont bien dispersés et les suspensions sont stables pendant au moins un mois [5]. Ces NP et NTC ont été soigneusement caractérisés avant de mener les expériences biologiques : diamètre, forme, surface spécifique, cristallinité, pureté.

Résultats scientifiques, originalité, discussion par rapport à l'état de l'art

Production et caractérisation des NP et NTC

Dans le cadre du projet SIGNANOTOX, des NP ont été produites dans les laboratoires des partenaires (NP-Au, NTC, NP-Si et SiC, NP-TiO₂ anatases et rutilés). Les NP-SiC, NP-Si, et NP-TiO₂ sont produites par pyrolyse laser, les NTC par dépôt chimique en phase vapeur et les NP-Au par synthèse chimique en phase liquide.

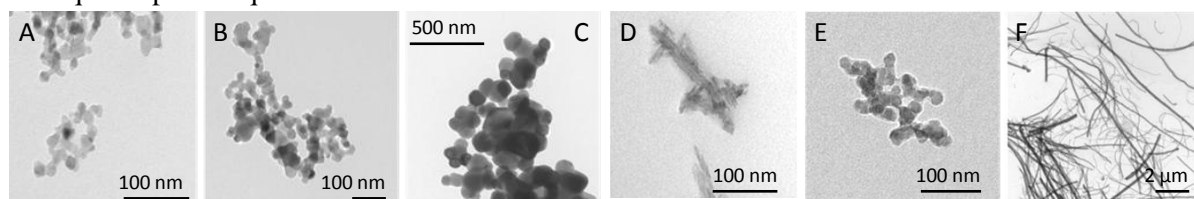


Figure 1. Image MET des NP et NTC utilisées dans le cadre du projet signanotox. NP-TiO₂ 12 nm (A), 25 nm (B), 140 nm (C), 9×68 nm (D), NP-SiC (E), NTC (F).

Après caractérisation physico-chimique approfondie [4, 6] ces NP et NTC sont mis en suspension par ultrasonification, en utilisant le surfactant biocompatible le plus approprié.

Accumulation et répartition cellulaire

Toutes les NP testées dans le cadre de ce projet s'accumulent dans toutes les lignées cellulaires testées. L'ampleur de l'accumulation dépend cependant du type cellulaire : elle est massive dans les cellules A549 et NRK-52^E [4, 7], et plus faible dans les cellules Hep-G2. Les NP et NTC se répartissent dans le cytoplasme des cellules, préférentiellement dans des vésicules et vacuoles (Figure 2A-C).

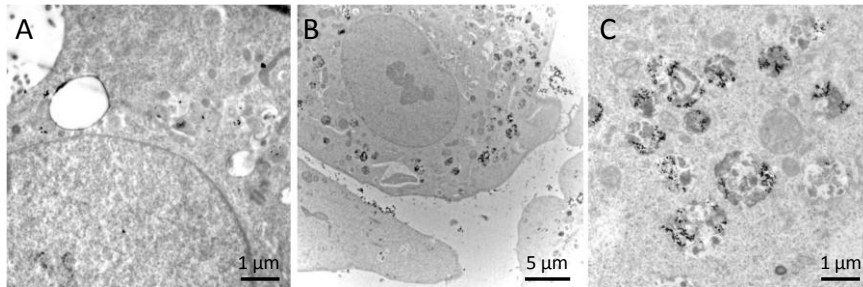


Figure 2. Accumulation cellulaire de NP-TiO₂. Images MET de l'accumulation de NP-TiO₂ de 12 nm dans des cellules NRK-52^E (A) et A549 (B et C).

Quelques NP-TiO₂ et NP-SiC ont été observées dans le noyau cellulaire (Figure 2A) [3], en revanche nous n'avons pas observé de NP dans les mitochondries.

Cytotoxicité

Les effets cytotoxiques aigus sont modérés, parmi les NP testées aucune n'induit plus de 30% de mortalité cellulaire après exposition à des concentrations massives (10-100 μg/ml) durant 24 à 48 h. Les lignées cellulaires présentent des sensibilités variables vis-à-vis des NP, les cellules NRK-52^E étant les plus sensibles (35% de mortalité lors d'une exposition de 48 h à 100 μg/ml de NP-TiO₂) et les cellules A549 étant les plus résistantes (25% de mortalité dans les mêmes conditions) [7]. Les effets cytotoxiques des NP-TiO₂ dépendent de leur taille et de leur forme, mais pas de leur phase cristalline. Ainsi les NP-TiO₂ sphériques les plus fines (12-25 nm), qu'elles soient anatases ou rutiles, entraînent davantage de mortalité cellulaire que les NP de plus grande taille ou de forme allongée (140-700 nm) [3, 4]. En revanche, les effets cytotoxiques causés par les NP-SiC dépendent peu de leur diamètre (20-58 nm) et du ratio Si/C [6]. Les NP-Au n'entraînent pas de mortalité cellulaire, sauf celles enrobées de DTDTPA, cet effet cytotoxique semble donc être causé par le DTDTPA plus que par les NP elles-mêmes. Enfin, les NTC causent peu de mortalité cellulaire, et cette mortalité ne dépend ni de la pureté des NTC, ni de leur longueur [4].

Un point important à noter est l'interférence des NP et NTC avec certains tests de cytotoxicité. Les NTC interfèrent avec presque tous les tests, seule la coloration au bleu trypan et le test de survie clonogénique ont donné des résultats non discutables. Les NP d'or absorbent la lumière dans une gamme étendue de longueur d'ondes, et de ce fait les tests de cytotoxicité impliquant une lecture d'absorbance ne sont pas applicables. Ainsi il est essentiel de prendre en compte une éventuelle interférence des NP lors de l'utilisation de tests de cytotoxicité commerciaux.

Stress oxydant

Toutes les NP testées entraînent une augmentation du contenu intracellulaire de ROS, ce qui signifie qu'elles sont la cause d'un stress oxydant. Dans le cas des NTC et des NP-TiO₂, cette production massive de ROS débute après 15 mn d'exposition, augmente linéairement jusqu'à atteindre un maximum après 4 h d'exposition. Cette production maximale est alors maintenue durant les 12 premières heures d'exposition, puis diminue après 24 h d'exposition [3]. Du fait de cette production massive de ROS, une augmentation de l'activité des systèmes antioxydants cellulaires est à prévoir. Aucune modification du contenu intracellulaire en glutathion, l'antioxydant moléculaire majeur contenu dans les cellules, et aucune modification de l'activité des enzymes responsables du maintien de l'équilibre redox cellulaire (catalase, SOD, GPx, GR) n'a été observé après exposition aux NP-TiO₂ [3]. En revanche lorsque les cellules sont exposées aux NP-SiC, une diminution du contenu cellulaire en glutathion est observée, elle s'accompagne d'une diminution des activités SOD et GR [6].

Un important stress oxydant est donc détecté suite à l'exposition des cellules aux NP-SiC, et dans une moindre mesure suite à l'exposition aux NP-TiO₂ et NTC. Les conséquences d'un tel stress oxydant peuvent être très dommageables à la survie cellulaire : de l'endommagement des lipides (peroxydation lipidique) et protéines (oxydation d'acides aminés et cassures induites dans les protéines), causant des défauts structurels et fonctionnels aux cellules, aux lésions oxydatives de l'ADN.

Génotoxicité

Les NTC, NP d'or et NP-SiC ne causent que très peu de dommages à l'ADN. En revanche une augmentation importante de nombre de cassures à l'ADN est observée après exposition à 50-100 µg/ml de NP-TiO₂ [3, 8]. Ces cassures ne sont pas des cassures double-brin puisque le marquage de l'histone γ-H2AX ne révèle pas d'augmentation du nombre de foci nucléaires de cette protéine. Parmi les NP testées, aucune n'est clastogène ni aneugène d'après le test des micronoyaux. Enfin une forte augmentation du nombre de bases oxydées de l'ADN, en particulier du nombre d'adduits 8-oxodG a été détectée après exposition aux NP-TiO₂. Les NP les plus fines causent le plus de cassures et le plus de lésions oxydatives de l'ADN [3].

Impact sur le transcriptome

La recherche de gènes communs, modulés par l'ensemble des NP sur les lignées A549 et Hep-G2, montre qu'il ne semble pas exister de signature toxicologique de l'exposition à ces NP sur ces deux lignées, même si des tendances se dégagent. La première tendance est que les gènes modulés le sont dans le sens de la surexpression plutôt que la sous-expression. Il y aurait donc plutôt une activation de la transcription après exposition aux NP et NTC. Sur la lignée A549, les NTC impactent surtout les processus de biosynthèse et les processus métaboliques de l'ARN : ils entraînent notamment une surexpression de gènes codant des facteurs régulateurs de l'épissage alternatif des ARN messagers et de facteurs permettant le recrutement des ribosomes sur les ARN messagers. Certains gènes codant des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN voient également leur expression modulée. Les NP-TiO₂ quant à elles induisent des modulations de l'expression de gènes codant des protéines intervenant dans le métabolisme primaire de la cellule, l'activité des organites, le cycle cellulaire, la réponse aux dégâts de l'ADN. Ces données feront l'objet de publications futures.

Faits marquants, retombées prévisibles et perspectives de valorisation

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre du projet SIGNANOTOX est résumé dans la figure 3. Les NP testées sont peu cytotoxiques, mais sont génotoxiques, la réponse la plus marquée étant observée après exposition aux NP-TiO₂ les plus fines (diamètre <100 nm). Cette réponse est observée à la fois au niveau phénotypique (apparition de cassures et de bases oxydées de l'ADN) et au niveau transcriptionnel (amplification de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la réponse cellulaire aux dégâts de l'ADN). Toutes les NP induisent un stress oxydant caractérisé par l'augmentation de la concentration intracellulaire de ROS, mais n'entraînent que peu de modulations dans les systèmes de maintien de la balance redox cellulaire.

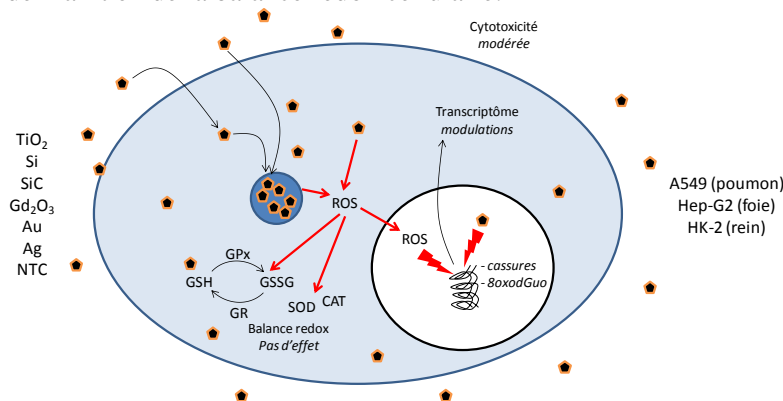


Figure 3. Récapitulation des effets des NP sur plusieurs lignées de cellules eucaryotes. ROS : espèces réactives de l'oxygène. GSH, GSSG : glutathion. GPx : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, SOD : superoxyde dismutase, CAT : catalase.

Au niveau transcriptionnel, nous n'avons pas mis en évidence d'ensemble de gènes qui voient leur expression modulée par l'ensemble des NP testées, sur les deux lignées cellulaires testées. En revanche les travaux menés dans le cadre de ce projet soulignent clairement les effets génotoxiques et pro-oxydants des NP et NTC.

Notons toutefois que ces travaux ont été menés sur des lignées cellulaires, *in vitro*, et devraient être validés sur des modèles plus complexes et certainement plus représentatifs, tels que des cultures de cellules primaires, des modèles *ex vivo* ou *in vivo*. Il conviendrait également de compléter cette étude par des données acquises sur des cellules exposées à des concentrations plus faibles de NP, qui seraient plus représentatives des doses auxquelles les travailleurs et les populations pourraient être exposés en cas de contamination accidentelle. Si de tels effets génotoxiques et pro-oxydants sont observés lors d'expositions chroniques de modèles représentatifs, alors il conviendra de décrypter les mécanismes par lesquels ces effets s'exercent. Enfin il convient d'identifier les caractéristiques physico-chimiques des NP avec lesquelles ces effets toxiques sont corrélés, de façon à permettre, à terme, le développement de NP « safe by design », sûres de par leur conception.

Références

1. Rapport d'expertise collective du comité d'experts spécialisés "Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements" de l'AFSSET, groupe de travail "Nanomatériaux-exposition du consommateur et de l'environnement. *Evaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement*. 2010.
2. Rapport du groupe de travail de l'AFSSET "Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements". *Nanomatériaux et sécurité au travail*. 2008.
3. Jugan, M.-L., et al., *Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells*. *Nanotoxicology*, 2011. sous presse.
4. Simon-Deckers, A., et al., *In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes*. *Toxicology*, 2008. 253(1-3): p. 137-46.
5. Simon-Deckers, A., Effets biologiques de nanoparticules manufacturées: influence de leurs caractéristiques. *Thèse de doctorat*. Soutenue le 5 décembre 2008.
6. Barillet, S., et al., *In vitro evaluation of SiC nanoparticles impact on A549 pulmonary cells: cyto-, genotoxicity and oxidative stress*. *Toxicol Lett*, 2010. 198(3): p. 324-30.
7. Barillet, S., et al., *Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study*. *J Nanopart Res*, 2009. 12(1): p. 61-73.
8. Jugan, M.L., et al., *Cytotoxic and genotoxic impact of TiO₂ nanoparticles on A549 cells*. *Journal of biomedical nanotechnology*, 2011. 7(1): p. 22-23.

Publications issues du projet

1. M.-L. Jugan, S. Barillet, A. Simon-Deckers, N. Herlin, S. Sauvaigo, T. Douki and M. Carrière. Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxic effects and impair DNA repair activity in vitro. *Nanotoxicology*, sous presse.
2. A. Casanova, M. Carrière, and N. Herlin-Boime. Dispersion of Aeroxil P25 TiO₂ nanoparticles in media of biological interest for the culture of eukaryotic cells. *Journal of biomedical nanotechnology*, 7(1), 24-25, 2011.
3. M.-L. Jugan, S. Barillet, A. Simon-Deckers, S. Sauvaigo, T. Douki, N. Herlin and M. Carrière. Cytotoxic and genotoxic impact of TiO₂ nanoparticles on A549 cells. *Journal of biomedical nanotechnology*, 7(1), 22-23, 2011.
4. M. Carrière, A. Casanova, N. Herlin-Boime. Dispersion of TiO₂ nanoparticles and stability of suspensions in media of biological interest for the culture of eukaryotic cells. *Proceedings Material Research Society*, 2011.
5. A.-N. Petit, C. Aude Garcia, S. Candeias, A. Casanova, P. Catty, P. Charbonnier, M. Chevallet, V. Collin-Faure, M. Cuillel, T. Douki, N. Herlin-Boime, C. Lelong, S. Luche, E. Mintz, J.-M. Moulis, V. Nivière, S. Ollagnier de Choudens, T. Rabilloud, J.-L. Ravanat, S. sauvaigo, M. Carrière and I. Michaud-Soret. Interference between nanoparticles and metal homeostasis. *Journal of physics: conference series*, 2011.
6. « Les nanoparticules d'or » O. Pluchery et M. Carrière. *Techniques de l'ingénieur*, 2011.
7. S. Barillet, M.L. Jugan, M. Laye, Y. Leconte, N. Herlin-Boime, C. Reynaud, M. Carrière. In vitro evaluation of SiC nanoparticles impact on A549 pulmonary cells: cyto-, genotoxicity and oxidative stress. *Toxicol. Lett.*, 198(3): 324-30, 2010.
8. S. Barillet, A. Simon-Deckers, N. Herlin-Boime, M. Mayne-l'Hermite, C. Reynaud, D. Cassio, B. Gouget, M. Carrière. TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes cyto- and genotoxicity. *J. Nanopart. Res.*, 12 : 61-73, 2010.
9. S. Barillet, M.L. Jugan, A. Simon-Deckers, Y. Leconte, N. Herlin-Boime, M. Mayne-l'Hermite, C. Reynaud, M. Carrière. SiC nanoparticles cyto- and genotoxicity to Hep-G2 cells. *Journal of physics: conference series*, 2009.
10. A. Simon-Deckers, B. Gouget, M. Mayne-L'Hermite, N. Herlin-Boime, C. Reynaud, M. Carrière. In vitro investigation of oxide nanoparticles and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*, 253: 137-146, 2008.
11. A. Simon, C. Reynaud, M. Mayne, N. Herlin, H. Desqueyroux, B. Gouget and M. Carrière. In vitro investigation of TiO₂, Al₂O₃, Au nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes cyto- and genotoxicity on lung, kidney cells and hepatocytes. *Toxicology Letters* 172: S36, 2007.