

# Les problèmes posés par l'évaluation des risques des nanoparticules sur la santé

L'augmentation rapide de l'utilisation des nanoparticules et nanotubes dans l'industrie, pour la fabrication de produits très variés, pose de façon aiguë la question de l'exposition humaine et environnementale à ces nouveaux matériaux. L'acceptation par le public de ces développements technologiques, dont on dit qu'ils constituent une révolution industrielle, passe par une évaluation coût/bénéfice et une bonne connaissance des dangers potentiels qui leur sont associés. Des procédures réglementaires d'évaluation des dangers et des risques sont donc urgentes à mettre en place pour protéger la santé humaine et l'environnement. Dans une première approche, il avait été considéré par les autorités réglementaires que l'évaluation classique des risques des produits chimiques pouvait être appliquée aux nanoparticules. Cependant un nombre croissant de revues et articles de recherche publiés depuis 2005 ont conduit à une remise en question de cette approche.

## Pourquoi s'inquiète-t-on de la toxicité des nanoparticules ?

Comme les articles précédents de ce numéro d'*adsp* le montrent, il s'agit de particules dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nanomètres, ce qui inclut également le diamètre des nanotubes dont la longueur peut être de plusieurs micromètres. Les nanoparticules se rapprochent donc, par leurs dimensions, des particules atmosphériques ultrafines, comme les nanotubes se rapprochent de celles de l'amiante même si la composition chimique de ces produits manufacturés peut être très différente.

La question de l'impact sanitaire des particules atmosphériques fines et ultrafines ou PUF (PM 0,1 ou de diamètre aérodynamique < 100 nm), qui se retrouvent dans l'atmosphère à partir des processus de combustion ou qui peuvent se former secondairement au cours de réactions de nucléation, s'est posée avec acuité au cours des dix dernières années et est à l'origine des interrogations sur les nanoparticules. Elle est en partie liée aux données acquises sur les particules Diesel, mais aussi aux études expérimentales comparant les effets biologiques et la toxicologie de diverses particules manufacturées fines et ultrafines, en particulier des nanoparticules de carbone, de silice, de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), d'oxyde de zinc (ZnO)... Les résultats d'études épidémiologiques récentes, qui mettent en relation les quantités de PUF dans l'atmosphère et l'augmentation de la morbidité et de la mortalité cardio-respiratoires [49], montrent que cette préoccupation est justifiée.

En ce qui concerne les nanoparticules et les nanotubes, les seules données actuelles sont des données

toxicologiques, encore fragmentaires, souvent réalisées sur des cultures cellulaires, et quelques études toxicologiques chez l'animal. La plupart de ces études font état de résultats assez surprenants. En effet, si on compare, à concentration égale, des particules de même composition chimique mais de taille micrométrique ou nanométrique, les réponses biologiques sont généralement très différentes et les nanoparticules peuvent développer une toxicité qui n'apparaît pas pour les microparticules. Cette toxicité semble liée à l'augmentation de la surface spécifique, donc du nombre d'atomes en surface des particules insolubles, ce qui favorise les interactions avec les molécules biologiques. L'augmentation de la réactivité de surface est donc un des critères à prendre en compte pour l'évaluation du danger des nanoparticules. Par ailleurs, pour une même masse, 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, est fortement posée. D'autres facteurs importants à prendre en compte concernent la solubilité et la capacité à former des agglomérats.

Enfin, de nombreuses études épidémiologiques et toxicologiques ces dernières années ont montré que les particules atmosphériques fines et ultrafines, après inhalation, peuvent avoir des effets systémiques sur des organes tels que le cœur, qui ne sont pas des cibles directes. Il est donc important de comprendre les mécanismes mis en jeu et si ces particules sont capables ou non de franchir les barrières biologiques, en particulier la barrière respiratoire, pour être ensuite distribuées dans l'organisme. Ces questionnements soulevés à propos des effets sanitaires des particules atmosphériques se sont retrouvés dans les débats concernant la toxicité des nanoparticules et pour la mise en place des stratégies d'évaluation des risques associés.

## Quelles sont les voies potentielles d'exposition aux nanoparticules et comment peut-on caractériser l'exposition ?

La peau, l'appareil digestif et l'appareil respiratoire sont les voies potentielles d'entrée des nanoparticules manufacturées ; cependant, les études publiées concernent pour l'essentiel la voie respiratoire, en particulier pour l'évaluation du risque d'exposition des travailleurs dans les usines de fabrication. Comme nous l'avons évoqué ci-dessus, les nanoparticules posent un problème particulier d'ordre métrologique. Oberdorster [45] est un des premiers toxicologues à avoir mis en avant cet aspect très important de la métrologie particulaire : la masse n'est pas un bon critère d'évaluation pour les particules

**Francelyne Marano**  
Professeur, Université  
Paris-Diderot Paris 7

*Les références  
entre crochets renvoient  
à la bibliographie p. 77.*

ultrafines. Leur nombre et leur réactivité de surface peuvent leur conférer des propriétés spécifiques à masse et composition chimique identique si on les compare à des particules plus grosses. En effet, même si les nanoparticules sont agglutinées, leur caractéristique nanostructurée leur confère des propriétés toxicologiques particulières. Les méthodes conventionnelles de mesure de l'exposition relient la masse à la composition chimique des particules, mesures qui ne paraissent donc pas adaptées aux nanoparticules. La mesure du nombre de particules par volume est plus pertinente mais encore insuffisante ; les données les meilleures sont celles qui associent la distribution en taille, la surface, la masse et le nombre pour un volume donné. Les appareils actuels sont chers et la mesure de la distribution en taille depuis les nanomètres jusqu'aux micromètres encore assez difficile [56], mais il est essentiel d'avoir une évaluation fiable de l'exposition par la voie respiratoire pour apprécier le risque.

L'exposition par la peau a également été étudiée, car l'industrie cosmétique utilise les nanoparticules dans de nombreux produits dont des crèmes solaires qui contiennent des nanoparticules de  $TiO_2$  et de  $ZnO$ . Un rapport européen récent limite le risque de franchissement de la barrière cutanée aux peaux lésées [47]. Cependant, le passage par les follicules pileux reste possible et a été montré dans certaines conditions expérimentales. Il serait dépendant de la taille des nanoparticules et demande à être étudié.

La quantification de l'exposition par la voie alimentaire est très incertaine en l'absence de données précises sur les nanoparticules dans l'alimentation. Cependant, il est bien connu que des particules peuvent franchir la barrière intestinale et se retrouver ainsi dans l'organisme.

Il apparaît donc, avec ce bref résumé des expositions potentielles, que, si la voie respiratoire est la plus probable, les autres voies ne doivent pas être éliminées, en particulier la voie digestive, encore trop peu étudiée et que, pour une bonne évaluation de risque, il serait souhaitable d'avoir une appréciation de la part respective des différentes voies de contamination.

### **Les nanoparticules peuvent se déposer et persister dans l'appareil respiratoire**

La taille des particules détermine leur site de déposition dans l'appareil respiratoire et on peut ainsi mettre en évidence trois régions de dépôt : les régions naso-pharyngée et trachéo-bronchiale où le mécanisme de clairance est mucociliaire et l'élimination des particules rapide (en 24 heures environ), la région alvéolaire où la clairance macrophagique est plus lente, la demi-vie des particules pouvant atteindre des mois. Il est admis que les grosses particules ( $d > 5\mu m$ ) s'arrêtent dans la région naso-pharyngée, les particules de 1 à  $5\mu m$  dans la région trachéo-bronchiale, alors que les particules fines, inférieures à  $1\mu m$ , peuvent atteindre les régions bronchiolaire et alvéolaire et y persister.

Cependant, les nanoparticules se comportent de façon particulière dans la mesure où leur dépôt se fait à la

fois essentiellement dans les régions naso-pharyngée et alvéolaire. De plus, dans le poumon profond, leur élimination par le processus de clairance alvéolaire est perturbée. En effet, elles sont plus difficilement phagocytées que les particules fines par les macrophages alvéolaires, ce qui conduit à une persistance accrue et une interaction avec les cellules épithéliales. Un aspect important à prendre en compte est que les nanoparticules, en fonction de leur réactivité de surface, peuvent interagir avec des protéines biologiques qui les recouvrent et peuvent faciliter ensuite leur reconnaissance et leur phagocytose par les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, et ainsi augmenter leur accumulation dans le poumon ainsi que leur translocation.

Le cas des nanotubes est particulier. Ils sont appelés à être utilisés dans de nombreuses applications industrielles et leur structure ainsi que leur composition chimique sont très variables. Leur similitude de forme avec les fibres d'amiantose pose la question de leur persistance dans les poumons, même si on connaît actuellement peu de chose sur leur dépôt et leur capacité d'accumulation. La majorité des informations publiées portent sur l'amiantose et les fibres de substitution de l'amiantose. Si celles-ci sont suffisamment fines, même si elles sont très longues, elles peuvent atteindre le poumon profond et s'y déposer. Leur clairance par les macrophages alvéolaires est alors difficile car ceux-ci peuvent être dans l'incapacité de les phagocyter à cause de leur taille. Si elles sont peu ou pas solubles, elles vont s'accumuler et être à l'origine de pathologies. Ce schéma n'est pas actuellement démontré pour les nanotubes, mais leur diamètre inférieur à  $100\text{ nm}$  et leur longueur pouvant aller jusqu'à quelques dizaines de  $\mu m$  rendent possible un tel scénario [11].

### **Les nanoparticules peuvent franchir les barrières biologiques**

La question de la translocation des nanoparticules à travers les barrières biologiques chez l'homme a été posée par des études réalisées avec des nanoparticules de carbone de  $20\text{ nm}$  marquées au Technicium 99. L'une d'entre elles montre une translocation rapide vers le sang et une accumulation significative dans le foie [42], alors qu'une autre conteste ces résultats [5]. Cependant, si on considère aussi les études réalisées chez l'animal [15], il paraît très vraisemblable que les nanoparticules peuvent passer la barrière épithéliale vers l'interstitium pulmonaire. Elles seraient aussi capables de franchir la paroi des vaisseaux et de se retrouver dans le flux sanguin, distribuées ensuite au niveau de l'organisme. On évalue actuellement la translocation à 1 % de la quantité totale de nanoparticules inhalées. Leur accumulation dans des organes cibles a été étudiée à l'aide de nanoparticules modèles (ex : billes de polystyrène marquées). Le foie est le site majeur d'accumulation, mais une accumulation mineure dans le cœur et dans le rein a également été retrouvée. Par ailleurs, le passage des barrières hémato-encéphalique et placentaire est suspecté, mais encore insuffisamment démontré.

Une autre voie d'entrée potentielle est la voie olfactive. Des expériences anciennes chez le singe ont montré que des nanoparticules d'or colloïdal instillées dans les fosses nasales pouvaient être transportées vers le bulbe olfactif. La question d'un tel transfert se pose donc pour les nanoparticules manufacturées. Des observations troublantes d'inflammation chronique du cerveau et de processus accélérés de maladies neuro-dégénératives chez des chiens à Mexico ont été associées à la forte pollution particulaire de la ville [7].

### Les nanoparticules peuvent être à l'origine d'un stress oxydant associé à une réponse inflammatoire

La production d'ERO (espèces réactives de l'oxygène) est, en général, considérée comme un des mécanismes essentiels de toxicité des particules atmosphériques fines et ultrafines ainsi que des nanoparticules. De nombreuses études *in vitro* ont clairement mis en évidence que des particules ultrafines d'oxyde de titane ou de carbone produisaient davantage de radicaux libres que les mêmes particules plus grosses et provoquaient un stress oxydant plus important. Ces réactions seraient associées à une plus grande réactivité de surface en interaction avec les fluides biologiques et les cellules [12].

La réponse inflammatoire qui résulte de ces interactions et du stress oxydant est une manifestation particulièrement claire et bien documentée. Par exemple, le résultat d'un processus inflammatoire est observé dans des lavages broncho-alvéolaires (LBA) réalisés sur des volontaires après exposition à des échappements Diesel dilués [51]. L'infiltrat inflammatoire contient des neutrophiles (PNN), cellules jouant un grand rôle dans les bronchites chroniques mais également dans l'asthme et les rhinites allergiques. Les réponses obtenues dans les expositions humaines sont également observées dans les études chez l'animal et ont été bien analysées *in vitro*, sur cultures cellulaires [30]. Il n'existe pas à l'heure actuelle de données expérimentales sur des expositions humaines contrôlées à des nanoparticules, cependant la similitude des réponses observées chez l'animal laisse supposer des mécanismes de toxicité voisins, tout au moins pour les nanoparticules qui, comme les particules atmosphériques, sont capables de produire un stress oxydant.

### Des études récentes montrent que certains nanotubes de carbone sont responsables chez la souris de lésions semblables à celles de l'amiante

Deux publications récentes sont à l'origine d'une forte interrogation sur les risques associés à l'exposition à des nanotubes de carbone. La première, parue dans *Nature Nanotechnology* [48], montre que des nanotubes injectés dans l'abdomen de souris peuvent induire une inflammation et la formation de granulomes semblables à ceux induits par des fibres d'amiante. Cela ne survient que quand les nanotubes ont certaines caractéristiques de forme, droite et non courbe, et de longueur, long et non court. Une autre étude de cancérogénèse [52], par

injection intrapéritonéale chez une lignée de souris choisie pour sa susceptibilité à développer des tumeurs, montre que les nanotubes de carbone induisent l'apparition de mésothéliomes dans des proportions supérieures à l'amiante à des doses équivalentes.

Ces deux études, en particulier la seconde, ont utilisé des doses élevées et le mode d'exposition ne correspond pas aux voies normales. Cependant, elles posent clairement la question de la toxicité de ces produits et de leur persistance dans l'organisme qui, sur de longues périodes, seraient susceptibles d'être à l'origine de cancers.

### Quelles stratégies pour l'évaluation des risques associés aux nanomatériaux ?

Divers groupes de travail nationaux, européens (SCHENNIR), internationaux (OCDE), travaillent actuellement sur des stratégies d'évaluation des nanoparticules et nanotubes, en particulier dans le cadre de l'application du règlement Reach. Des groupes d'experts ont également publié au cours des dernières années des revues et des propositions de stratégies d'évaluation des risques de ces nanomatériaux en tenant compte des problèmes soulevés plus haut (par exemple, le rapport du groupe de travail de l'International Life Sciences Institute Research Foundation [44]). Aucune stratégie n'est actuellement définitivement acceptée, mais toutes ont des remarques et propositions communes. Elles soulignent la nécessité d'une caractérisation physicochimique très soignée des nanoparticules et nanotubes utilisés pour les évaluations toxicologiques, l'importance de matériaux de référence (benchmarks) permettant des comparaisons, la nécessité de déterminer le devenir des nanomatériaux dans les conditions réelles d'administration pour prendre en compte les modifications dans les milieux biologiques (agglutination, « coating »...). La question de la dose administrée doit être soigneusement traitée : masse, surface, nombre de particules. Les méthodes *in vivo* et *in vitro* utilisées en toxicologie des produits chimiques doivent être adaptées à ces matériaux. Les méthodes *in vitro* permettent d'obtenir rapidement des données pour des comparaisons et d'aborder des mécanismes d'action, mais elles nécessitent, pour des comparaisons pertinentes, l'utilisation de matériaux de référence communs et de bonnes définitions des modes d'exposition. Les études *in vivo* devraient se faire selon une approche par niveau (Tier). Le premier niveau (Tier 1) permettrait de caractériser les réponses toxiques en fonction de la voie la plus probable d'exposition. Le second niveau (Tier 2) inclurait des modèles animaux de pathologie (asthme, bronchite chronique, maladies cardio-vasculaires), les effets des expositions multiples, des études de translocation et de bio-persistance, les effets sur la reproduction et des études mécanistiques incluant des approches de toxico-génomique et de toxico-protéomique. Il apparaît cependant que, sans une bonne évaluation des expositions en condition réelle et une bonne connaissance du cycle de vie des nanomatériaux, l'évaluation des risques professionnels et environnementaux reste hasardeuse. ❖