

Modèles toxicologiques expérimentaux appliqués aux nanomatériaux

Interférences, biais méthodo- logiques et conséquences de leur application

Fabrice Nesslany est chef du service de toxicologie génétique de l'Institut Pasteur de Lille¹.

1 Une problématique médiatique ?

La problématique des interférences et éventuels biais méthodologiques, ainsi que les conséquences que cela peut avoir dans l'interprétation des résultats issus de modèles toxicologiques expérimentaux et la perception par la société

civile au travers des associations, sont très médiatisées.

1.1. Les derniers retentissements médiatiques

Les gros titres de ces deux-trois dernières années sont souvent anxiogènes. Par exemple, un article datant de 2015 titre « *Des nanoparticules dans les poumons des enfants parisiens* » (**Figure 1**).

1. www.pasteur-lille.fr

Figure 1

Un article datant de 2015 montre la découverte de nanoparticules dans les poumons d'enfants parisiens.

Pollution : des nanoparticules dans les poumons d'enfants parisiens

Le 24 octobre 2015 à 20h00 - Mis à jour le 26 octobre 2015 à 10h31 - par Ysabelle Silly

Des chercheurs français ont trouvé des nanotubes de carbone dans les poumons d'enfants. Ces particules seraient similaires à celles présentes dans les gaz d'échappement de véhicules parisiens.

**Figure 2**

La Une des Échos de septembre 2016 mentionne la découverte de nanoparticules dans le cerveau.

Pollution : des nanoparticules découvertes dans le cerveau

LES ECHOS | Le 10/09 à 13:02 | Mis à jour à 13:12 | 14 38 23



Une étude a révélé la présence chez certains sujets de minuscules particules de magnétite, probablement issues de la pollution atmosphérique, dans le cerveau - Shutterstock

**Figure 3**

Des « substances à risque » auraient été trouvées dans les bonbons.

En septembre 2016, le journal *Les échos* publie un article sur « Une étude qui révèle la présence de nanoparticules dans le cerveau, celles-ci pourraient favoriser le développement de maladies neurodégénératives du type Alzheimer » (**Figure 2**).

Ensuite, à la période d'Haloween, on retrouve la problématique de la présence de nanoparticules dans les confiseries (**Figure 3**).

La **Figure 4** montre elle aussi que la peur des nanoparticules est très largement relayée.

1.2. Les conséquences du relais médiatique

Il y a un an environ, les résultats d'une enquête ont été publiés sous le titre « 100 % des produits testés contiennent des nanoparticules » dans la revue 60 millions de consommateurs



Figure 4

La peur suscitée par les nanoparticules illustrée dans les médias.

(Figure 5). Au-delà du titre un peu provocateur, cela pose la question de l'aspect réglementaire et de l'obligation de la mention « nano » sur les étiquettes (Figure 6). En janvier 2018, l'association de consommateurs UFC Que

Choisir a décidé de porter plainte contre neuf groupes agroalimentaires et cosmétiques pour, précisément, ne pas avoir mentionné la présence de nanoparticules dans des confiseries, des dentifrices ou encore des déodorants (Figure 7).



Figure 5

La Une de 60 millions de Consommateurs dénonce la non-mention des nanoparticules.

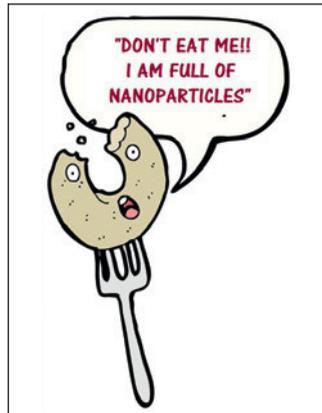


Figure 6

Dessin humoristique : « Ne me mangez pas ! Je suis plein de nanoparticules ! »



Figure 7

UFC-Que Choisir a déposé plainte contre neuf groupes agroalimentaires et cosmétiques pour n'avoir pas mentionné la présence de nanoparticules dans des confiseries, dentifrices, déodorants.



Figure 8

En octobre 2018, Casino a décidé de supprimer l'E171 (dioxyde de titane) de tous ses produits avant la fin de l'année. Cet additif, autorisé, est soupçonné d'être à l'origine de cancers.

Une conséquence récente, datant d'octobre 2018, est que le groupe Casino a décidé de supprimer l'ingrédient E171, colorant à base de dioxyde de titane, de tous ses produits. Cet additif autorisé est soupçonné d'être à l'origine de cancers (Figure 8), mais nous verrons plus loin que la toxicité du E171 est en fait très controversée.

Les autres Supermarchés ont suivi : les Supermarchés U ont publié en octobre 2018 une liste de 82 substances, dont le dioxyde de titane, qu'ils s'engagent à supprimer (Figure 9).

2 Sommes-nous réellement face à une problématique sanitaire émergente ?

La définition du nanomonde est rappelée dans de nombreux chapitres de cet ouvrage

Chimie, nanomatériaux, nanotechnologies (EDP Sciences, 2019). Les nanomatériaux sont des objets dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm, soit de l'ordre du milliardième de mètre. La Figure 10 positionne les nano-objets dans le monde du vivant et dans le monde des produits fabriqués par l'homme. Il faut savoir que la recommandation de la Commission Européenne est que l'on considère un objet comme un nanomatériau à partir du moment où il contient au moins 50 % en nombre de particules à l'échelle nanométrique.

2.1. Les préoccupations de santé publique

La question essentielle posée au toxicologue est de savoir si ces particules très petites

Figure 9

Liste non exhaustive des colorants supprimés par les magasins U.



- Colorants
- Jaune orange 5
- Jaune de quinoléine
- Carmoisine
- Rouge Allura
- Tartrazine
- Ponceau 4R
- Dioxyde de titane
- Caramel-émulsifiant
- Caramel au sulfite d'ammonium
- Carmin de cochenille

**LISTE DES 82 SUBSTANCES CONTROVERSÉES
QUE LES MAGASINS U S'ENGAGENT À SUPPRIMER**

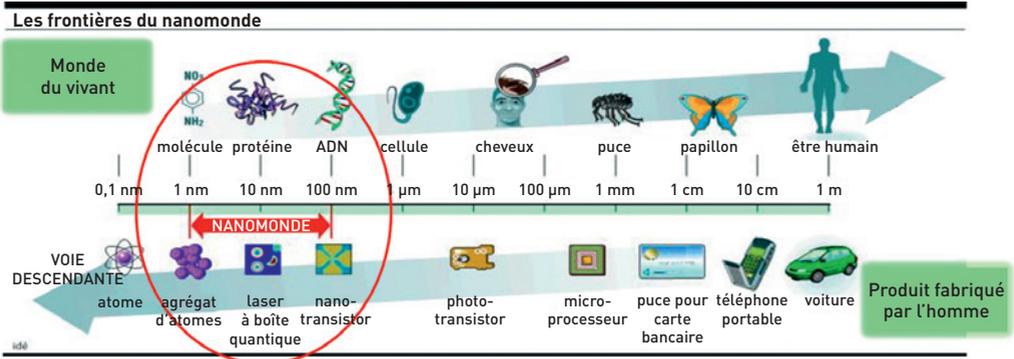


Figure 10

On peut positionner la dimension nanométrique sur une échelle comparant les tailles des objets dans le monde du vivant et celles des produits fabriqués par l'homme.

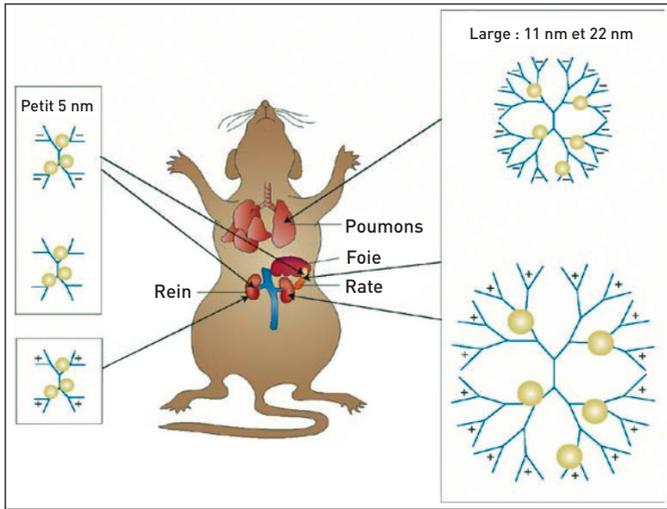


Figure 11

Chez la souris, les barrières physiologiques sont de l'ordre du nanomètre.

sont plus dangereuses que des particules macrométriques² de même composition, si elles peuvent générer de nouveaux dangers, ou les amplifier ?

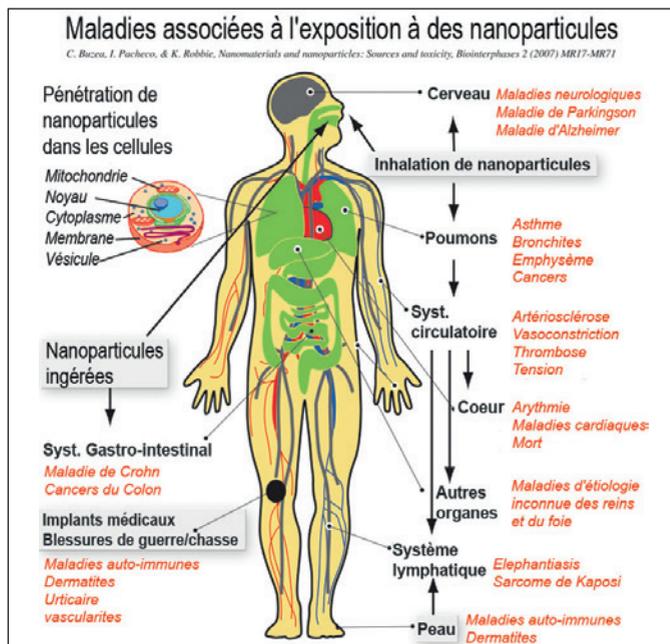
59 paramètres définissent un nanomatériau manufacturé (NMs), et parmi ces 59 paramètres, une dizaine concerne

ses propriétés physico-chimiques. Ces propriétés physico-chimiques, souvent qualifiées d'inédites, vont leur conférer des propriétés très intéressantes en termes d'efficacité, mais cela pourrait aussi conduire à des propriétés toxicologiques spécifiques. Il est notamment important d'étudier le comportement de ces matériaux dans l'organisme (**Figure 11**) et savoir s'ils peuvent franchir des barrières physiologiques.

2. Macrométrique : particule de taille macroscopique (à l'échelle humaine), par opposition à une nanoparticule.

Figure 12

Selon les voies de pénétration des nanoparticules dans le corps humain, leurs conséquences sur l'organisme sont différentes.



Les autres questions qui se posent sont les suivantes (Figure 12) :

- les nanomatériaux peuvent-ils passer d'un organe à un autre (phénomène de translocation) et quels sont les organes cibles ?
- les nanomatériaux peuvent-ils modifier les réponses immunitaires ?
- les nanomatériaux peuvent-ils être toxiques pour la reproduction ?
- peuvent-ils être génotoxiques, cancérigènes ?

L'exposition est un autre volet du risque à considérer : quelle est l'exposition réelle de la population générale, de la population professionnelle ?

2.2. Évaluation des risques liés aux nanomatériaux

Au travers des modèles expérimentaux, l'un des derniers

rapports de l'ANSES³, édité en 2014, rapporte que « certains » nanomatériaux peuvent induire des effets sur les organismes vivants :

- passage de certaines barrières physiologiques (la barrière hémato-placentaire, la barrière testiculaire, intestinale, alvéolocapillaire) ;
- persistance de NMs dans des organismes vivants ;
- retard de croissance ou anomalies dans le développement ou la reproduction ;
- effet sur le système nerveux central chez l'animal ;
- phénomène d'immunosuppression ;

3. L'ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, responsable de l'évaluation des risques sanitaires au travail.

- réactions d'hypersensibilité et d'allergies ;
- effet génotoxique et cancérigène.

Ces effets ont été observés pour certains nanomatériaux et dans certaines conditions expérimentales, mais tous les nanomatériaux n'entraînent bien évidemment pas l'ensemble de ces effets.

2.3. Caractérisation des dangers toxicologiques d'un nanomatériau

Les modèles mis en œuvre pour caractériser les dangers toxicologiques des NMs sont ceux utilisés pour les produits chimiques ordinaires, et, étant données les spécificités des nanomatériaux, il est légitime de se poser la question de la réelle pertinence de ces modèles expérimentaux dits standards. Ne met-on pas en exergue des effets qui sont non intrinsèques aux nanomatériaux, ou à l'inverse ne génère-t-on pas des résultats négatifs non pertinents ?

Il est donc nécessaire d'apporter des modifications et/ou des adaptations méthodologiques à ces modèles expérimentaux pour améliorer leur fiabilité et leur applicabilité aux nanomatériaux.

Il faut tenir compte de la notion chère à Paracelse⁴ de la problématique du niveau de doses utilisées dans ces modèles. Le choix des systèmes d'essai, les méthodes de traitement,

les voies d'administration, tous ces paramètres vont influencer directement sur la nature du résultat, sans oublier les biais, les interférences possibles avec d'autres phénomènes.

Tous ces différents points montrent la nécessité d'adapter la stratégie d'évaluation (sans en modifier les principes de base).

3 Stratégie de l'évaluation toxicologique : modification et/ou adaptation méthodologique aux nanomatériaux

Les étapes clés sont : la caractérisation physico-chimique, les méthodes de préparation, le choix des systèmes d'essai et des conditions expérimentales, la prise en compte des biais et des interférences.

3.1. Méthode de préparation : protocole de dispersion

Le protocole de dispersion, quel qu'il soit, influence directement sur la qualité et la représentativité de la suspension nanoparticulaire préparée (Figure 13). Par exemple, K. Donaldson (expert reconnu dans le monde des nanos) a constaté qu'un nanomatériau est très mal dispersé dans de l'eau pure et forme des agrégats, ce qui n'est pas le cas lorsque des protéines sont ajoutées (Figure 14) (voir le *Chapitre de E. Fattal*). Mais la nature même du dispersant influence la dose intracellulaire, donc la nature du résultat.

La corona est cette couronne constituée de protéines et d'autres éléments qui se fixent à



Figure 13

La dispersion de nanomatériau s'effectue dans une enceinte fermée.

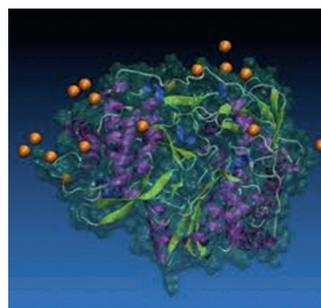


Figure 14

On peut modéliser les protéines en 3D pour étudier leur influence sur la formation d'agrégats.

4. Paracelse : médecin suisse du XVI^e siècle, considéré comme le père de la toxicologie : « C'est la dose qui fait le poison ».

la surface du nanomatériau. Sa composition dépend du milieu dans lequel le nanomatériau est dispersé. La corona obtenue lors de la préparation d'une suspension nanoparticulaire utilisée dans un test *in vitro* sera donc très différente de celle produite lors d'un test *in vivo*. De plus, elle sera différente *in vivo*, en fonction de la voie d'entrée, selon que ce soit par exemple la peau ou les poumons.

Il faut donc, dans tous les tests d'évaluation toxicologiques, justifier :

- la méthode de préparation de la suspension nanoparticulaire ;
- la nature du dispersant utilisé ;
- l'ajout du coformulant (sérum, mucus...);
- la méthodologie suivie pour disperser les nanoparticules entre elles ;
- la métrologie au moins en termes de taille et de charge.

2.2. Choix du système d'essai : le concept de dose

Paracelse (**Figure 15**) disait « *C'est la dose qui fait le poison* », avec les nanomatériaux, un nouveau paradigme a été proposé « *La dose fait l'effet* ».

Pour des nanomatériaux, les doses qu'on pourrait utiliser *in vitro* peuvent être suffisantes pour provoquer des effets de type pro-inflammatoires, toxiques et génotoxiques *in vitro*, alors que le même niveau de dose *in vivo* ne serait suffisant que pour induire des défenses anti-oxydantes.

Par exemple, cette différence d'effet/dose entre des essais *in vitro* et *in vivo* a été montrée dans le cas des fibres

nanopersistantes et des silices, et nombre de publications vont dans le même sens. Cette notion est d'autant plus importante qu'on se tourne de plus en plus vers des substitués à l'expérimentation animale, donc, vers des modèles utilisant des cultures de cellules, qui se doivent d'être le plus prédictif possible.

Ainsi, la comparaison des réponses *in vivo* et *in vitro* est souvent difficile, et de nombreux exemples montrent une absence totale de corrélation entre une réponse de type génotoxique *in vitro*, un test à court terme, et le réel pouvoir cancérogène d'un nanomatériau.

In vivo sur l'animal, il faut également éviter des doses excessives sans rapport avec des doses réalistes qui risquent d'amener vers des résultats non pertinents.

Un exemple assez emblématique est une publication d'une équipe qui a administré pendant 90 jours du nano TiO₂ à des souris, par voie intranasale, jusqu'à 10 mg/kg/jour. Une de leurs conclusions a été « *les nanoparticules de dioxyde de titane peuvent s'accumuler dans le cerveau, entraîner un stress oxydant, une nécrose tissulaire, ainsi qu'une apoptose⁵ au niveau de l'hippocampe* ».

Pour un homme de 50 kg, une dose de 10 mg/kg/j administrée pendant 90 jours représente une dose cumulée de 45 g, dose finale qui apparaît totalement irréaliste. Dans tous les cas, il est nécessaire de justifier

5. Apoptose : aussi appelée mort cellulaire programmée, c'est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction, en réponse à un signal.



Figure 15

Paracelse est considéré comme le père de la toxicologie.

les niveaux de doses utilisées dans les tests d'évaluation. Le choix de la dose maximale peut s'appuyer sur la qualité de la dispersion (au-delà d'une certaine dose la dispersion nanoparticulaire est hétérogène : il ne faut pas dépasser ce niveau de saturation qui risque d'entraîner des effets non intrinsèques) ou même utiliser les données de charge nanoparticulaire observée au niveau de certains organes dans des études *in vivo* en prenant un facteur de sécurité.

3.2. Choix du système d'essai

3.2.1. Le modèle cellulaire

Le choix du modèle cellulaire est très important. En fonction de l'origine de la lignée cellulaire (d'origine humaine, animale, etc.) et du tissu d'origine, les cellules vont être plus ou moins sensibles à une exposition à des nanoparticules. Elles utilisent des voies métaboliques différentes, elles n'ont pas forcément les mêmes récepteurs à leur surface, elles ont des capacités de réparation de l'ADN et des statuts antioxydants différents. Par exemple, la génotoxicité des nanomatériaux dépend majoritairement de mécanismes oxydants. Donc, si on utilise des cellules qui sont artificiellement démunies de ces systèmes antioxydants, les effets de génotoxicité qui ne sont pas nécessairement intrinsèques seront exacerbés. Il faut choisir un modèle cellulaire qui est capable d'internaliser les NMs (ce qu'on appelle l'endocytose), mais aussi également capable de les externaliser (l'exocytose). Si ce n'est

pas le cas on observera une concentration intracellulaire totalement artéfactuelle.

Le modèle cellulaire doit donc être caractérisé. Il faut au moins connaître ses capacités d'endo et d'exocytose, le niveau de ses systèmes antioxydants, son statut P53, etc.

L'origine du modèle cellulaire doit être préférentiellement humaine, et si possible représentative d'un organe possiblement exposé.

3.2.2. La méthode de culture et le mode de traitement

Plusieurs choix sont possibles pour le mode de culture :

- de façon classique, en 2D, en monocouches ;
- en utilisant des inserts pour faire pousser les cellules en trois dimensions ;
- en utilisant une interface air/liquide ;
- en utilisant les nouvelles méthodes de culture pour obtenir ce qu'on appelle des sphéroïdes, ou même des organoïdes.

Il faut réaliser un design argumenté du mode de traitement.

3.2.3. Le choix du modèle animal

En cas d'essais *in vivo*, le choix du modèle animal est également très important. Pour les études toxicocinétiques, l'espèce animale choisie doit être prédictive pour l'homme, ce qui peut être complexe en raison des phénomènes d'opsonisation⁶, qui varient d'une espèce à l'autre.

6. Opsonisation : processus biochimique par lequel une molécule recouvre la membrane d'une cellule cible pour favoriser sa phagocytose.

Pour les études d'inhalation, le modèle rat, pourtant souvent utilisé, peut se révéler être un mauvais modèle. En effet chez le rat, en particulier avec des particules de type PSLT (particules faiblement solubles et peu toxiques), on peut observer des effets spécifiques dans certaines conditions expérimentales. Le rat est en effet sujet à avoir une très mauvaise clairance pulmonaire⁷, donc l'élimination des NMs se fait mal et on observe des surcharges pulmonaires qui sont probablement spécifiques de cette espèce. Chez le rat, ce phénomène arrive très vite, et ce résultat pourrait être peu transposable à l'homme. La transposition des essais sur le rat est encore très controversée.

3.3. Interférences avec les paramètres mesurés

Les nanomatériaux peuvent interférer avec les tests d'évaluation de cytotoxicité, en particulier avec les réactifs utilisés (colorants, agents fluorescents...), ce qui risque de biaiser la réponse.

Des incompatibilités avec certaines conditions expérimentales peuvent être observées, en particulier pour les deux tests de génotoxicité cités dans le Chapitre d'E. Fattal, le test des comètes (qui est un test de fragmentation de l'ADN), et le test du micronucleus⁸,

qui est un test d'aberrations chromosomiques⁹.

Pour le test du micronucleus, on utilise souvent dans le protocole standard une substance pour bloquer les cellules à une certaine phase de la mitose¹⁰, et cette substance (cytochalasine B) inhibe l'endocytose des NMs avec le risque d'avoir un résultat négatif qui n'est pas pertinent.

À l'inverse, pour le test des comètes, s'il y a des nanomatériaux résiduels postérieurement au traitement, ils peuvent interagir avec l'ADN lors de la phase d'électrophorèse. Cette fois, on risque de générer un résultat positif qui n'est pas pertinent.

Il apparaît donc nécessaire d'apporter des modifications et des adaptations pour améliorer la sensibilité et la spécificité des tests, en particulier *in vitro*, et aussi pour éviter des tests *in vivo* inutiles.

4 Les difficultés d'évaluation liées au grand nombre de nanomatériaux

Dans les produits de consommation courante, il existe un très grand nombre de nanomatériaux. De plus, pour des nanomatériaux de même composition, on a de nombreuses déclinaisons possibles. C'est le cas du dioxyde de titane, qui existe sous trois formes cristallines différentes (Figure 16) avec la possibilité que ces trois formes réagissent différemment.

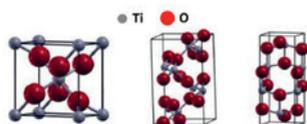


Figure 16

Le dioxyde de titane peut se trouver sous trois formes cristallines. De gauche à droite : rutile, brookite et anatase.

7. Clairance pulmonaire : capacité des poumons à débarrasser un liquide biologique (le sang, la lymphe, etc.) d'une substance donnée.

8. Micronucleus : petits noyaux d'organismes unicellulaires.

9. Aberration chromosomique : altération au niveau du chromosome (anomalie qui peut être de structure ou de nombre).

10. Mitose : les événements chromosomiques de la division cellulaire.

Ensuite, la taille des particules, la forme, la chimie de surface, l'enrobage, la fonctionnalisation, et bien d'autres éléments, feront que les nanomatériaux pourront avoir des réactivités très différentes. Il faut aussi prendre en compte le fait que ces nanomatériaux évoluent tout au long de leur cycle de vie (Figure 17). Le nanomatériau produit au niveau de l'usine sera probablement très différent en sa fin de vie. Ainsi, l'homme pourrait être exposé en tant que travailleur à une certaine forme de nanos, puis en tant que consommateur à d'autres formes, y compris après la fin de vie du nanomatériau.

Il apparaît donc matériellement impossible de tester toutes ces formes de façon exhaustive. Des estimations effectuées à ce sujet ont montré qu'il faudrait déjà plusieurs décennies pour tester les nanos aujourd'hui sur le marché.

4.1. Établir des liens entre les différentes nanoformes de NMS

Les comportements (éco)-toxicologiques et cinétiques dépendent des paramètres physico-chimiques. Plusieurs stratégies sont utilisées pour prévoir les dangers et les risques malgré la diversité et le nombre de nanomatériaux :

- le grouping : regroupe les matériaux en catégories selon leur composition, ou selon leur comportement, leur réactivité, ou encore selon leur danger ou leur cycle de vie ;
- le read-across utilise des données toxicologiques existantes pour un nanomatériau pour combler le manque de

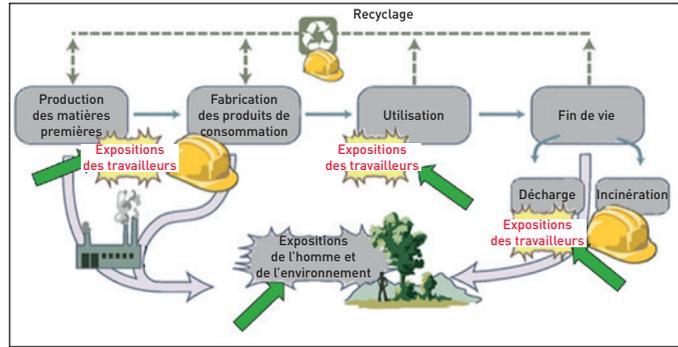


Figure 17

Cycle de vie des nanomatériaux manufacturés. Les nanomatériaux ont tout un cycle de vie pendant lequel ils peuvent être modifiés.
Source : National Nanotechnology Initiative.

données pour un autre nano, puis regroupe ensuite les différentes nanoformes en catégories. Un texte de l'agence européenne (ECHA), réédité en 2017, propose une stratégie à suivre.

Les catégories de nanoformes sont identifiées à partir des paramètres chimiques et physiques qui sont ensuite utilisés pour prédire le comportement et la réactivité (Figure 18).

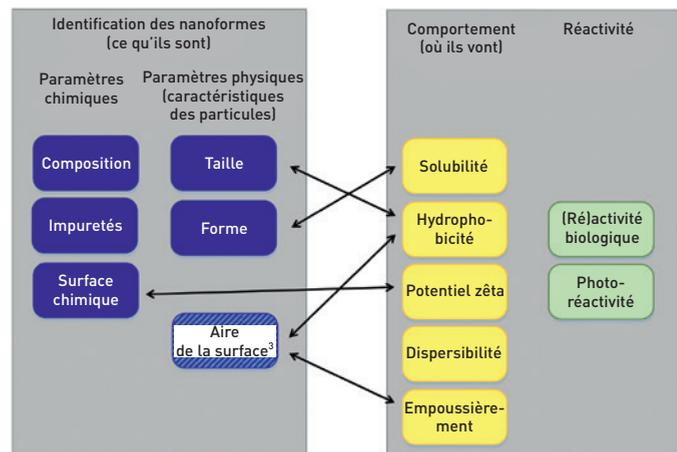


Figure 18

On peut comparer des nanoformes pour prédire leur réactivité.



Figure 19

Le dioxyde de titane, sous forme de E171, est présent dans de nombreux aliments.

Cette approche peut nécessiter le développement de nouveaux types d'outils spécifiques comme par exemple les QSAR ou des nouvelles méthodes expérimentales dites « haut débit » pour réaliser plus rapidement l'étude des relations structure/activité.

Pourtant, malgré tous les outils et toutes les approches, beaucoup d'interrogations demeurent comme le montre l'exemple suivant du colorant alimentaire E171.

4.2. L'exemple du dioxyde de titane dans le colorant alimentaire E171

Le E171 est un colorant blanc à base de particules de dioxyde de titane (**Figure 19**). La forme nano du dioxyde de titane (de taille inférieure à 10 nm) est transparente. Pour que le TiO_2 soit blanc (parce qu'il diffuse la lumière), il ne faut pas que le diamètre des particules soit inférieur à 200-300 nm. Le E171 contient environ 30 % en nombre et 3 % en masse de formes nanométriques de TiO_2 . Il faut noter que le E171 n'est donc pas considéré comme un nanomatériau selon la définition de la Commission Européenne puisque la fraction nanométrique est inférieure à 50 %.

L'agence européenne de sécurité alimentaire (ESFA) a publié son évaluation en juin

2016 et conclu que les marges de sécurité calculées entre la dose sans effet et l'exposition des consommateurs ne posaient pas de préoccupation sanitaire pour le E171.

De nouvelles études ont été réalisées sur ce sujet, dont les quatre citées ci-dessous (trois études *in vitro* et une *in vivo*), qui ont entraîné une nouvelle saisine au niveau de l'agence européenne, qui a évalué ces quatre articles pour savoir si les résultats devaient modifier la précédente évaluation.

4.2.1. Étude *in vitro* de l'ingestion de nano- TiO_2 sur un modèle cellulaire de l'épithélium de l'intestin grêle

L'objectif était d'étudier comment l'exposition aiguë (4 h) ou chronique (5 j) à des nano- TiO_2 influence la fonction barrière intestinale (**Figure 20**), la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), la réaction pro-inflammatoire, l'absorption de nutriments (fer, zinc, acides gras) et la fonction enzymatique (phosphatase alcaline intestinale).

Des effets négatifs ont été observés dans tous les cas : diminution de la fonction de la barrière intestinale, production d'espèces radicalaires, augmentation de la signalisation pro-inflammatoire, diminution du transport du fer, zinc, et des acides gras.

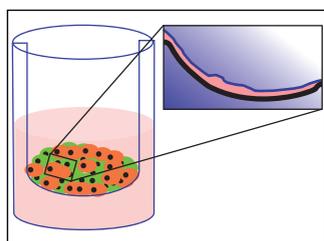


Figure 20

On peut modéliser la barrière intestinale humaine par une co-culture Caco-2/HT29-MTX.

L'analyse de cette étude par l'EFSA est critique sur différents points :

- sur l'origine de TiO_2 : ce n'est pas du E171 mais du nano- TiO_2 de 30 nm. De plus, pour minimiser l'agglomération et l'agrégation, les nanoparticules de TiO_2 ont été préparées en ajoutant du sérum.

- le modèle cellulaire n'avait pas été caractérisé, et au niveau de l'interprétation, il n'y a pas de relation dose/effet ;

- le modèle d'essai repose sur l'hypothèse que toutes les particules ingérées sont en contact avec la surface de la paroi intestinale, ce qui est irréaliste car que le nombre de nanoparticules par gramme est comparable au nombre de micro-organismes par gramme au niveau intestinal, c'est-à-dire quelques milliards.

Donc l'EFSA a conclu qu'il n'est pas raisonnable d'extrapoler ces résultats *in vitro* au *in vivo*.

4.2.2. Évaluation *in vitro* de la formation d'espèces radicalaires oxydées et de la génotoxicité

L'article de Proquin¹¹ paru en 2017 se proposait d'évaluer la formation d'espèces radicalaires oxydées (ERO) et la génotoxicité, toujours *in vitro*, sur des cellules humaines Caco-2 et HCT116, avec l'objectif de distinguer les actions de la

11. Proquin H., Rodríguez-Ibarra C., Moonen C.G., Urrutia Ortega I.M., Briedé J.J., de Kok T.M., van Loveren H., Chirino Y. (2017). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions, *Mutagenesis*, 32:139-149.

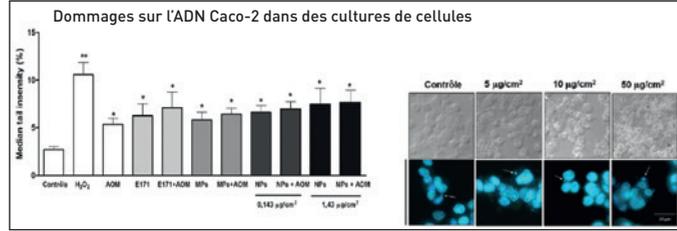


Figure 21

Le E171 a provoqué des lésions chromosomiques dans des cultures de cellules HCT116.

forme nanométrique de celles de la forme micrométrique.

La formation d'ERO a effectivement été observée mais uniquement avec les particules micrométriques et pas avec les particules nanométriques. La génotoxicité a été évaluée à partir de l'induction de la fragmentation de l'ADN (Figure 21). On voit que les réponses sont très peu reliées aux doses et faiblement significatives, et on observe également quelques aberrations chromosomiques. Cette étude montrerait donc que le E171 induit des espèces radicalaires et présente un potentiel génotoxique.

Les critiques de l'EPSA portent sur le modèle de cellules utilisées, qui sont des cellules non différenciées, et il se trouve qu'une publication encore plus récente sur ce même type de cellules, mais cette fois-ci différenciées, a montré une absence d'induction de dommages à l'ADN, donc un résultat complètement contradictoire. De plus, au niveau de l'absorption *in vivo*, on sait que la présence naturelle de mucus au niveau de l'épithélium¹² intestinal diminue sensiblement le niveau d'absorption. Donc les doses de l'expérience réalisée *in vitro* en l'absence de mucus sont beaucoup plus élevées qu'*in vivo*.

12. Épithélium intestinal : couche superficielle protectrice.

Figure 22

Le modèle de E171 étudié ne représente pas forcément l'additif alimentaire.

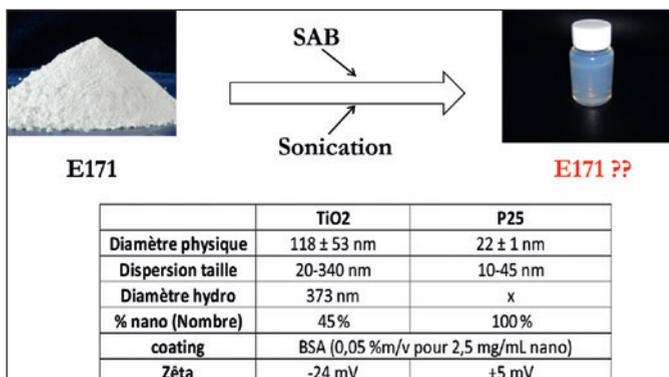
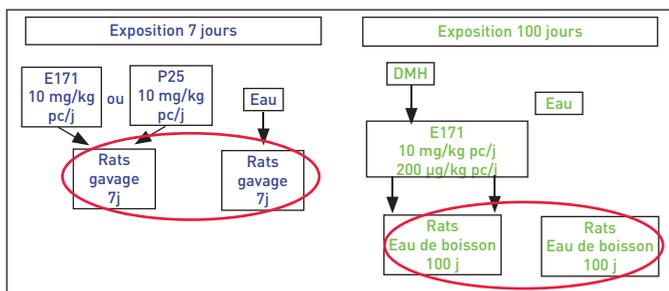


Figure 23

Un protocole par gavage ou d'exposition via l'eau de boisson a été élaboré pour tester le E171 sur les rats.



Au niveau de l'interprétation, compte tenu de la composition du E171 qui contient 30 à 40 % de nanoparticules en nombre et des preuves déjà disponibles de génotoxicité *in vitro* des nano et microparticules de TiO₂, la génotoxicité du E171 pouvait déjà être prévue, mais la transposition des résultats au *in vivo* n'est toujours pas évidente.

4.2.3. Études *in vivo* de la toxicité du E171

Le très bon article¹³ de l'INRA de Toulouse a posé nombre de questions. Le TiO₂ utilisé dans cette étude a été considéré comme n'étant pas représentatif de l'additif alimentaire

E171, comme le montre la comparaison des propriétés physico-chimiques (Figure 22). De plus, la préparation a également utilisé du sérum bovin. Les voies d'exposition ne sont pas non plus représentatives de la complexité de la matrice alimentaire par voie orale (Figure 23). Donc cette approche sur l'animal a été qualifiée d'éventuellement utile pour identifier un danger, mais pas du tout adaptée pour faire une évaluation des risques.

Le titre de l'étude était assez éloquent puisque c'était « *le E171 induit des lésions pré-néoplasiques* »¹⁴ ; en fait, le seul paramètre qui a été utilisé

13. Bettini S, Boutet-Robinet E, Cartier C, Coméra C, Gaultier E, Dupuy J. *et coll.* Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci Rep.* 2017 ; 7 : 40373.

14. Lésions pré-néoplasiques : étymologiquement « avant la nouvelle croissance », lésions qui apparaissent avant la tumeur, où les cellules prolifèrent. Elles sont donc des marqueurs d'un possible développement cancéreux.

pour cette conclusion est l'observation des ACF, qui sont des foyers de cryptes aberrantes au niveau intestinal (**Figure 24**). Ce type de lésion correspond à l'histopathologie la plus précoce en lien avec le cancer colon rectal.

La conclusion était que le E171 entraîne une augmentation du nombre et de la taille des ACF après ingestion de 10 mg de TiO_2 pendant 100 jours. Il a été conclu qu'un seul marqueur n'est pas suffisant pour décrire des lésions pré-néoplasiques

et que la conclusion possible était que les lésions pré-néoplasiques étaient supposées, mais pas certaines.

La proposition de l'EFSA et également de l'agence française est de réitérer cet essai sur le E171, et sur un plus grand nombre d'animaux.

Finalement l'EFSA a conclu que les résultats de ces quatre études ne méritaient pas de rouvrir le dossier actuel concernant le TiO_2 du E171, qui est donc toujours autorisé.

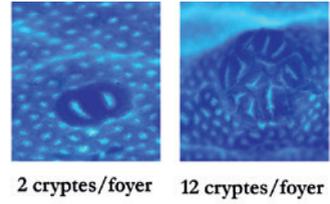


Figure 24

Comparaison entre un foyer à 2 cryptes et 12 cryptes.

L'avenir de l'évaluation des risques nanospécifiques

Compte tenu de la spécificité de ces matériaux, il est nécessaire de modifier ou d'adapter les méthodologies des caractérisations des dangers. Avant même de le mettre en suspension, le nanomatériau doit être parfaitement caractérisé au niveau de toutes ses propriétés physico-chimiques, ce qui correspond selon la norme ISO TC229 à l'étude de dix paramètres. Il existe des plateformes en Europe et également en France équipées pour réaliser ces études. La méthode de préparation et la formulation sont très importantes, de même que le contrôle de cette formulation.

Le choix du système d'essai est capital : il faut argumenter le choix du modèle expérimental, ainsi que les conditions de traitement. Il faut prendre garde aux problèmes de biais et d'interférences qui peuvent fausser l'interprétation. Normalement, dans les essais, il faudrait intégrer des matériaux de référence pour montrer la sensibilité et la spécificité du modèle et surtout, en particulier *in vitro*, reproduire les résultats.

Enfin, étant donné la grande variété de nanomatériaux et leur capacité à changer au cours de leur cycle de vie, il est nécessaire de développer de nouveaux outils et de nouvelles approches prédictives.

Cependant, il faut prendre conscience que l'évaluation des risques sanitaires liés aux nanomatériaux au cas par cas est impossible, donc il est nécessaire d'adapter aussi la stratégie de l'évaluation de la sécurité (**Figure 25**), et, comme on vient de le voir, d'utiliser de nouveaux concepts, tels que le grouping, le ranking, des nouveaux outils, de nouvelles approches, (Safe by Design, Read-across, méthodes haut-débit, QSAR), et également renforcer la description des expositions.



Figure 25

Lors d'une étude toxicologique, on mesure les dangers et l'exposition afin d'évaluer les risques, et on fournit un indice de confiance pour la santé et l'environnement.