

# Dangers Génotoxiques des nanomatériaux :

## Spécificités de caractérisation et conséquences pour l'évaluation des risques

Dr Fabrice NESSLANY

Chef du service de toxicologie génétique

Institut Pasteur de Lille

# Constat

Les Nanomatériaux Manufacturés (NMs) présentent pour la plupart des propriétés physiques et chimiques inédites

*59 paramètres OCDE : ENV/JM/MONO(2008)13/REV*

➔ Déterminent leur « réactivité » biologique

# Préoccupations santé publique

Qu'en est-il de leurs propriétés biologiques et des interactions avec l'organisme humain (*environnement*)?

Les **risques** (dangers & exposition) restent à évaluer.

- Comment les NMs se comportent-ils **dans organisme** ?
- Peuvent-ils persister, franchir les **barrières biologiques** et passer d'un organe à un autre?  
Quels organes cibles ?
- Peuvent-ils modifier les **réponses immunitaires**, être toxique pour la **reproduction**, être **généotoxiques, cancérrogènes** ?
- Quelle **exposition** pour la population générale et professionnelle ?

➔ Caractérisation minutieuse des effets indésirables et des expositions potentiels est nécessaire.

# Préoccupations santé publique

➔ Évaluation des risques liés aux nanomatériaux  
« *Enjeux et mise à jour des connaissances* »

ANSES, Mai 2014

<http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/AP2012sa0273Ra.pdf>

# Caractérisation des dangers

- ❖ Depuis 2010, pour certains nanomatériaux, observation d'effets sur des organismes vivants (modèles expérimentaux) :
  - ✓ Passage de certaines barrières physiologiques (hémato-placentaire, testiculaire, intestinale, cutanée, alvéolo-capillaire)
  - ✓ Persistance de NMs dans des organismes vivants
  - ✓ Retards de croissance, anomalies ou malformations dans le développement ou la reproduction chez des espèces modèles des compartiments environnementaux
  - ✓ Effets sur le système nerveux central chez l'animal
  - ✓ Phénomènes d'immunosuppression
  - ✓ Réactions d'hypersensibilité et d'allergie
  - ✓ Effets génotoxiques et cancérogènes de certains NMs

# Caractérisation des dangers

- ❖ Depuis 2010, observation, pour certains nanomatériaux, d'effets sur des organismes vivants (modèles expérimentaux) :
  - ✓ Passage de certaines barrières physiologiques (hémato-placentaire, testiculaire, intestinale, cutanée, alvéolo-capillaire)
  - ✓ Persistance de NMs dans des organismes vivants
  - ✓ Retards de croissance, anomalies ou malformations dans le développement ou la reproduction chez des espèces modèles des compartiments environnementaux
  - ✓ Effets sur le système nerveux central chez l'animal
  - ✓ Phénomènes d'immunosuppression
  - ✓ Réactions d'hypersensibilité et d'allergie
  - ✓ **Effets génotoxiques** et cancérogènes de certains NMs

# Mécanismes possibles de génotoxicité des NMs

	Primaires		
	Direct		
Mécanismes	<ul style="list-style-type: none"><li>• Particules pénètrent dans le noyau ➔ Interaction directe avec ADN</li><li>• "Relargage" radicaux libres qui lèsent l'ADN ou perturbent la ségrégation des chromosomes pendant la mitose</li></ul>		

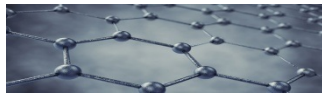
# Mécanismes possibles de génotoxicité des NPs

	Primaires		
	Direct	Indirect	
Mécanismes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Particules pénètrent dans le noyau → Interaction directe avec ADN</li> <li>• "Relargage" radicaux libres qui lèsent l'ADN ou perturbent la ségrégation des chromosomes pendant la mitose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Particules épuisent <math>\Sigma</math> <b>antioxydants</b> (GSH) → Augmentation de l'état endogène des <b>dommages oxydatifs</b> à l'ADN</li> <li>• Augmentation des <b>dommages oxydatifs</b> résultant de l'<b>activité mitochondriale</b></li> <li>• Inhibition réparation ADN ...</li> </ul>	



# Mécanismes possibles de génotoxicité des NPs

	Primaires	Secondaires
Mécanisme	<p style="text-align: center;"> <span style="color: red;">➔</span> MoA principalement oxydation            EROs &amp; ERNs : Rôle clé dans la génotoxicité des NPs         </p>	
	chromosomes pendant la mitose	• Inhibition réparation ADN ... (Inflammation Produits)



## Batterie Standard de génotoxicité

→ Batterie standard  $\geq 3$  tests (option 1) :

### 1 - *in vitro* test sur bactéries

Bacterial Reverse Mutation Test, i.e. Ames test (OCDE 471)

### 2- *in vitro* sur cultures cellulaires

- In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test (OCDE 476)

- and/or In Vitro Chromosomal Aberrations test (Micronucleus Test, OCDE 487)

- or Metaphase Analysis Test, OCDE 473)

### 3 - *in vivo* sur moelle osseuse de rongeur

Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (OCDE 474)



# Batterie Standard de génotoxicité

→ Batterie standard  $\geq 3$  tests :

*in vitro* test sur bactéries

Bacterial Reverse Mutation Test

*in vitro* sur cellules

**→ Pertinence de ces modèles standard selon recommandations lignes directrices internationales ?**

**→ Interprétation des données de ces essais standard de génotoxicité?**

**→ Interférence avec inflammation, apoptose ?**

*in vitro*

de rongeur

Procyte Micronucleus Test (OCDE 474)

Test, OCDE 487)



## Batterie Standard de génotoxicité

→ Batterie standard  $\geq 3$  tests :

1 - *in vitro* test sur bactéries

→ **Pénétration** dans les bactéries ?

→ Impossible de démontrer une **interférence avec les fonctions mitochondriales** !

→ **Plus forte dose recommandée selon OCDE** : 5000  $\mu\text{g}$ /boîte !!

→ **Interaction NP suspensions avec solvant, avec agarose** ?



## Batterie Standard de génotoxicité

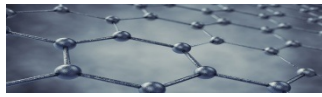
→ Batterie standard  $\geq 3$  tests :

*in vitro* test sur bactéries

2 - *in vitro* cultures cellulaires

- Plus forte concentration recommandée OCDE : 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  !
- Interaction NP suspensions avec protéines (sérum), milieu de culture?
- Utilisation de cellules murines

Information sur capacité d'endocytose, d'exocytose,  
Statuts p53 & AOX !



## Batterie Standard de génotoxicité

→ Batterie standard  $\geq 3$  tests :

*in vitro* test sur bactéries

*in vitro* cultures cellulaires

3 - *in vivo* sur moelle osseuse de rongeur

- Interaction suspensions NP avec excipient ?
- Réel(s) organe(s) cible? (moelle osseuse ?!)
- Voie d'administration ?
- Plus forte dose recommandée OCDE : 2000 mg/kg !
- Interférence avec inflammation (Trouiller B. et al., 2009) ?

# Constat

Remise en question de la **pertinence** de ces systèmes d'essai dans le cadre des essais de sécurité.

Soit

Développement réglementation complètement nouvelle & guidelines spécifiques

Ou

Evaluation toxicologique non significativement différente d'1 évaluation "conventionnelle", mais avec certaines adaptations spécifiques (plus rapide)

# Constat

Remise en question de la **pertinence** de ces systèmes d'essai dans le cadre des essais de sécurité.

Soit

Développement réglementation complètement nouvelle & guidelines spécifiques

Ou

Evaluation toxicologique non significativement différente d'1 évaluation "conventionnelle", mais avec certaines adaptations spécifiques (plus rapide)

- ➔ Adaptation des tests et/ou endpoints (menu & recettes)
- ➔ Nécessité de mettre en œuvre une analytique très spécifique!
- ➔ Prédicativité des tests *in vitro*? Quel type cellulaire?



# Constat

Nbse publications indiquent que les NMs peuvent être génotoxiques *in vitro* (Gonzalez et al., 2008; Landsiedel et al., 2009; Singh et al., 2009 etc...).

⇔ Résultats « faussement positifs » dans des tests de génotoxicité *in vitro* ?

Exemple des fibres non bio-persistantes (Donaldson K et al, 2010) :

- Fortes **doses non physiologiques** utilisées *in vitro* non atteignables *in vivo*,  
→ Suffisantes pour provoquer des effets pro-inflammatoires, génotoxiques et/ou cytotoxiques *in vitro* ⇔ Doses beaucoup plus faibles obtenus *in vivo* seulement suffisantes pour induire une défense AOX,
- Etudes de génotoxicité *in vitro* = **court-terme** : Temps pour raccourcir ou dissoudre des fibres longues non bio-persistantes insuffisant  
→ fibres longues, même non bio-persistantes exercent des effets (ex. des fibres de verre non biopersistantes, qui se trouvent être aussi génotoxiques *in vitro* que l'amiante)

Schulz et al. (2011) : Comparaison des résultats *in vitro* & *in vivo* de 2 SiO<sub>2</sub> : Effets génotoxiques observés *in vitro* NON reproduits *in vivo*.

Roller (2011) : Pas de corrélation entre probabilité d'une réponse positive *in vitro* avec cancérogenèse

Chen T et al (2014) : Les systèmes *in vitro* pour l'évaluation de la génotoxicité ont généré un plus grand nombre de résultats + que les systèmes *in vivo* (TiO<sub>2</sub>)

.....

## Tests validés (OCDE)

	<b>Mutation génique</b>	<b>Mutation Chromosomique</b>	<b>Lésions Primaires ADN</b>
<b>Procaryotes</b>	Ames	-	SOS chromotest
<b>Eucaryotes In vitro</b>	Mutation géniques sur cellules de mammifères  Tests levures	Analyses de métaphases Micronucleus  Tests levures	UDS  SCE
<b>Eucaryotes In vivo</b>	Drosophiles Spot test Specific locus test Souris transgéniques	Analyses de métaphases  Micronucleus Dominant létal	UDS  SCE Comet assay

# Tests validés sujets à archivage

	Mutation génique	Mutation Chromosomique	Lésions Primaires ADN
Procaryotes	Ames	-	SOS chromotest
Eucaryotes In vitro	Mutation géniques sur cellules de mammifères  Tests levures	Analyses de métaphases Micronucleus  Tests levures	UDS  SCE
Eucaryotes In vivo	Drosophiles Spot test Specific locus test Souris transgéniques	Analyses de métaphases  Micronucleus Dominant létal	UDS  SCE Comet assay

# Tests validés *in vitro* et non sujets à archivage

	Mutation génique	Mutation Chromosomique	Lésions Primaires ADN
Procaryotes	Ames	-	
Eucaryotes In vitro	Mutation géniques sur cellules de mammifères	Analyses de métaphases <b>Micronucleus</b>	

→ Le test du **micronucleus *in vitro*** (OCDE 487) semble approprié (même si quelques adaptations seront nécessaires. Cf S Doak, 2011)

- Utilisable sur de nbx types cellulaires
- Capable de MEE des mécanismes clastogènes et aneugènes

→ Les **tests std de mutation génique** (Ames, MLA/TK) peu adaptés

# Tests validés *in vivo* et non sujets à archivage

	Mutation génique	Mutation Chromosomique	Lésions Primaires ADN
Eucaryotes In vivo	Souris transgéniques (07/2011)	Analyses de métaphases  Micronucleus	Comet assay

→ Pertinence du **test du micronucleus et AM *in vivo* std** (sur moelle osseuse) ?

→ Disponibilité du **test TGN** (cf enquête de l'ECHA)!

# Batterie std vs modifiée pour NMs

	Mutation génique	Mutation Chromosomique	Lésions Primaires ADN
Procaryotes	1- Ames	-	
Eucaryotes <i>In vitro</i>	2- Mutations géniques sur cellules de mammifères	2 bis – Analyses de métaphases  2 bis - Micronucleus	
Eucaryotes <i>In vivo</i>	Souris transgéniques	3 bis -Analyses de métaphases sur moelle osseuse  3- Micronucleus sur moelle osseuse	II intention - Comet assay

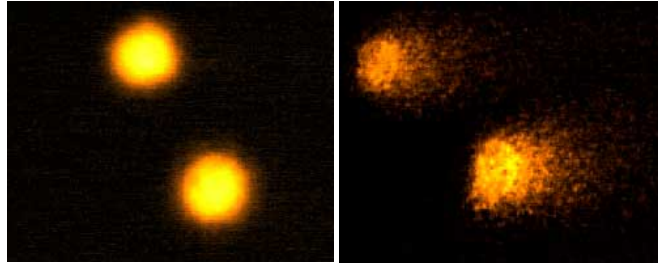
# Exemples de NANOGENOTOX

14 NMs commerciaux (mwNNTC, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>)

Altérations I<sup>aires</sup> de l'ADN

TdC +/- modifié (+ FpG)

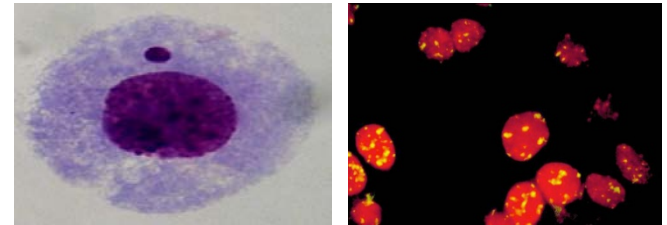
*In vitro & in vivo*



Aberrations chromosomiques

Micronucleus (OCDE 487)

*In vitro & in vivo*



Gavage & instillation, 3 doses, 3 administrations, 24 h intervalles



Comet assay +/- FpG

Micronucleus assay

➔ Comparaison résultats *in vitro* / *in vivo*



# Organe cible : Poumons

		BEAS 2B			16 HBE			A549		
		μnucleus	Comet 3 h	Comet 24 h	μnucleus	Comet 3 h	Comet 24 h	μnucleus	Comet 3 h	Comet 24 h
<b>TiO<sub>2</sub></b>	NM-102	-	+	+	-	+	-	-	+	-
	NM-103	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NM-104	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NM-105	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<b>SiO<sub>2</sub></b>	NM-200	-	+		-	+	-	-/-	(+)	-
	NM-201	-	(+)		-	-	-	+ / +	+	(+)
	NM-202	-	+		-	-	-	+ / +	+	(+)
	NM-203	(+)	+		-	-	-	- / (+)	-	+
<b>mw NTC</b>	NM-400	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-
	NM-401	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	NM-402	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	NRCWE-006	+	-	-	-	-	-	+	-	-

# Organe cible : Poumons

		BEAS 2B			16 HBE			A549			<i>In vivo</i>	
		µnucleus	Comet 3 h	Comet 24 h	µnucleus	Comet 3 h	Comet 24 h	µnucleus	Comet 3 h	Comet 24 h	Comet Poumon/ LBA	
<b>TiO<sub>2</sub></b>	NM-102	-	+	+	-	+	-	-	+	-	- / -	
	NM-103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- / -	
	NM-104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- / -	
	NM-105	-	-	-	-	-	+	-	+	-	- / ++	
<b>SiO<sub>2</sub></b>	NM-200	-	+		-	+	-	-/-	(+)	-	- / -	
	NM-201	-	(+)		-	-	-	+/+	+	(+)	- / -	
	NM-202	-	+		-	-	-	+/+	+	(+)	- / -	
	NM-203	(+)	+		-	-	-	-/(+)	-	+	- / -	
<b>mw NTC</b>	NM-400	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	- / -	
	NM-401	+	-	-	-	-	-	-	-	-	- / +	
	NM-402	+	-	-	-	-	-	+	-	-	- / -	
	NRCWE-006	+	-	-	-	-	-	+	-	-	- / (+)	

# Organes cibles : Colon & sang

		Caco-2			Comet <i>in vivo</i>	
		µnucleus	Comet		Côlon	
			3 h	24h		
<b>Ti O 2</b>	NM-102	-	-	+	+	
	NM-103	-	-	(+)	++	
	NM-104	-	-	-	+	
	NM-105	-	-	+	-	
<b>Si O 2</b>	NM-200	+ / -	+	+	-	
	NM-201	+ / -	-	(+)	-	
	NM-202	+ / -	(+)	(+)	-	
	NM-203	+ / -	+	+	-	
<b>m w C N T</b>	NM-400	(+)	-	-	-	
	NM-401	+	-	-	-	
	NM-402	+	-	-	-	
	NRCW E-006	-	-	-	-	

# Organes cibles : Colon & sang

		Caco-2			HuLy	Comet <i>in vivo</i>	
		μnucleus	Comet		μnucleus	Colon	Sang
			3 h	24h			
<b>TiO<sub>2</sub></b>	NM-102	-	-	+	(+)	+	-
	NM-103	-	-	(+)	+	++	-
	NM-104	-	-	-	+	+	-
	NM-105	-	-	+	-	-	-
<b>SiO<sub>2</sub></b>	NM-200	+ / -	+	+	-	-	-
	NM-201	+ / -	-	(+)	-	-	-
	NM-202	+ / -	(+)	(+)	-	-	-
	NM-203	+ / -	+	+	-	-	-
<b>mWCNT</b>	NM-400	(+)	-	-	-	-	-
	NM-401	+	-	-	-	-	-
	NM-402	+	-	-	(+)	-	-
	NRCW E-006	-	-	-	+	-	-

# Conclusions sur corrélation *vitro* / *vivo*

**Faible corrélation** résultats génotoxicité *in vitro* / *in vivo*

Limites des essais → "faux négatifs" / "faux positifs" ?

# Conclusions sur corrélation *vitro* / *vivo*

## Vitro + / vivo –

- Temps de traitement / exposition ?
  - ➔ Expositions à plus long terme
  - ➔ Dose intracellulaire de NM est importante (dépend de la technique exposition / dispersion + influence du dispersant)
  - ➔ Le mode d'exposition peut affecter la dose intracellulaire ➔ Détermination de la dose intracellulaire (comparaison *in vitro* & *in vivo*)

# Conclusions sur corrélation *vitro* / *vivo*

## Vitro + / vivo -

- Temps de traitement / exposition ?
  - Forme *in situ* identique à celle *in vitro* ?
- ➔ Dans des cellules en culture, nbx NMs base métal induisent une faible augmentation des lésions ADN qui semble se former **en continu** une fois les particules internalisées : idem *in vivo* ?
- ➔ La **corona formée *in vitro*** dans les milieux de culture medium (et même après dispersion avant instillation) **TRES DIFFERENTE** de celle produite naturellement qq soit la porte d'entrée (Donaldson K et al., 2010)
- ➔ MoGA peuvent  $\neq$  fction de la quantité de protéines présente dans les systèmes *in vivo* & *in vitro* (Magdolenova et al., 2013)

# Conclusions sur corrélation *vitro* / *vivo*

Vitro + / vivo –

- Temps de traitement / exposition ?
- Forme *in situ* identique à celle *in vitro* ?
- Caractéristiques des **types cellulaires** (endo- et exocytose, AOX, ...)!
- **Organe(s) exposés *in vivo* ?** → **Toxico-cinétique cruciale**



# Conclusions sur corrélation *vitro* / *vivo*

**Vitro – / vivo +**

- **Génotoxicité secondaire** ? (Tests *in vitro* incapables de la MeE)
- **Origines et caractéristiques des types cellulaires** :

Les lignées cellulaires d'origine identique ou de différent tissu peuvent être plus ou moins sensibles à l'exposition NM (*variation de voies métaboliques, des récepteurs de surface cellulaire, des capacités AOX et de réparation de l'ADN, la présence de différentes enzymes / hormones, etc*)... Karlsson et al 2008; Dusinska et al 2012.

➔ **Essais sur d'autres tissus / cellules cibles ?**

# Conclusions générales

## 1. Quels tests de génotoxicité sont appropriés pour les NMs?

- **Stratégie basée sur tests réglementaires ?**

- Test d'Ames (**inapproprié**)

- Test MLA/TK (**peu adapté**)

- Test du micronucleus *in vitro* : Avec des cellules cibles autres que celles préconisées standard? **Internalisation des NMs doit être démontrée**

- Test du micronucleus *in vivo* sur MO (Déetecte les substances génotoxiques systémiques), or :

- ✓ Doses élevées de NMs dans la MO peu probable

- ✓ Résultats négatifs pertinents quand preuve d'exposition!

→ **Adaptation des lignes directrices** de l'OCDE pour les tests de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* a été initiée par WPMN

(Workshop Party on the Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials, Ottawa, novembre 2013 – Paris, octobre 2014)

# Conclusions générales

## 1. Quels tests de génotoxicité sont appropriés pour les NMs?

- Stratégie basée sur tests réglementaires ?
  - **Prédictivité** des résultats du test des **comètes *in vitro***?
- ➔ La génotoxicité des NMs *in vitro* prédit-elle la génotoxicité *in vivo* et/ou la cancérogenèse? Peu d'études comparatives
- **Autres tests *in vivo* applicables** (test du micronoyau *in vivo* sur poumon, sur côlon qui peuvent être des organes cible).

# Conclusions générales

1. Quels tests de génotoxicité sont appropriés pour les NMs?
2. **Considérations méthodologiques et/ou modifications pour améliorer leur applicabilité et leur fiabilité :**
  - Adoption de protocoles standard de dispersion,
  - Sélection de lignées cellulaires appropriées (essais de toxicocinétique),
  - Caractérisation de l'absorption cellulaire,
  - Sélection de témoins positifs (et négatifs) appropriés (nano & non-nano),
  - S'assurer de la reproductibilité des résultats (intra- et interlabo),
  - Incompatibilités avec certaines conditions expérimentales,
  - Détection de génotoxicité induite par des mécanismes secondaires ?

# Conclusions générales

1. Quels tests de génotoxicité sont appropriés pour les NMs?
2. Considérations méthodologiques et/ou modifications pour améliorer leur applicabilité et leur fiabilité :
3. **Formation particulière pour les laboratoires réalisant les tests de génotoxicité des NMs**
4. **Lacunes dans les tests *in vitro* ?** (Détection de génotoxicité induite par des mécanismes secondaires?)  
Si de nombreuses particules ont montré des effets inflammatoires *in vitro* (et *in vivo*), peu se sont révélées cancérogènes!
5. **Nouveaux tests *in vitro* appropriés à développer pour tester les NMs?**
  - ➔ Test de mutation génique *in vitro* sur cellules humaines
  - ➔ Plate-forme haut débit

# Conclusions Nanogenotox

Etant donné les **différences** observées dans leur caractérisation **physico-chimique**, leur **génétoxicité** *in vivo* et *in vitro* et dans leur comportement **toxicocinétique**, impossible de classer comme “**mono substance**” les NMs appartenant à une **même famille**.

# Merci pour votre attention



[Fabrice.nesslany@pasteur-lille.fr](mailto:Fabrice.nesslany@pasteur-lille.fr)