



Actualités des polémiques récurrentes

Nanoparticules & nanomatériaux

Dr Fabrice Nessler
Laboratoire de Toxicologie Génétique
Institut Pasteur de Lille

- **Problématique de la définition officielle**
- **Adaptation des lignes directrices?**
- **Catégorisations?**
- **Traitement à des doses, formes, voies réalistes,**
- **Métriques,**
- **...**
- **Prédictivité des modèles *in vitro* (génomotoxicité) ?**

Constat

Nb ses 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 SiO₂ : Effets génotoxiques observés *in vitro* NON reproduits *in vivo*.

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

Umweltbundesamt (2014)* : Génotoxicité *in vitro* peut être non pertinente *in vivo* car mécanismes de défense AOX

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* (TiO₂)

.....

* *Carcinogenicity and Mutagenicity of Nanoparticles – Assessment of Current Knowledge as Basis for Regulation. Umweltbundesamt (Juillet 2014)*

→ **Fiabilité** et reproductibilité des
modèles de génotoxicité *in vitro* ?

→ Interprétation ?

→ **Prédictivité** (vs *in vivo*) ?

→ Exemple de NANOGENOTOX

NANOGENOTOX – Objectifs

Construire une **méthodologie robuste** (**sensibilité** et **spécificité**) à l'aide de tests(s) alternatif(s) afin de déterminer le **danger génotoxique** de nanomatériaux manufacturés

- **14 NMs commerciaux**

- **mwNTC (6)**
- **TiO₂ (4)**
- **SiO₂ (4)**

- **4 Work Packages scientifiques :**

- **Caractérisation (PC) + protocole de dispersion**
- **Toxicocinétique**
- **Génotoxicité *in vitro***
- **Génotoxicité *in vivo***

Génotoxicité *in vitro* - Objectifs

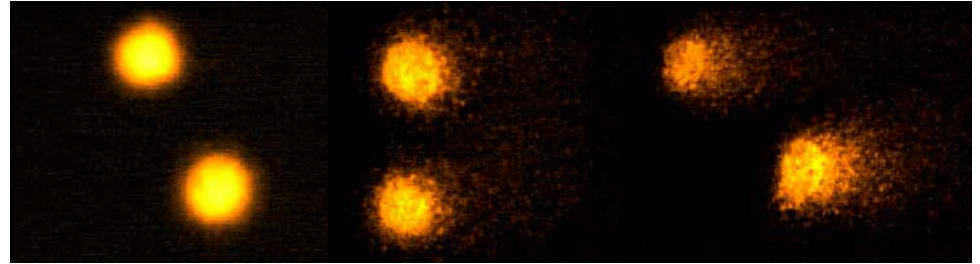
Générer des données de génotoxicité *in vitro* :

- Production de données à partir des **tests standards** et **modifiés** utilisant des **modèles cellulaires spécifiques** mimant des organes primo-exposés
- Réalisation d'un **ring test** *in vitro* (tests les plus prometteurs) sur NMs sélectionnés

Génotoxicité *in vitro* : Endpoints

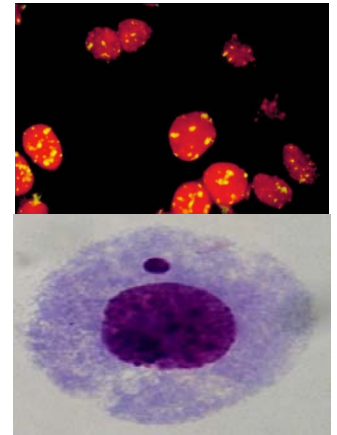
Altérations ^{laies} de l'ADN

- TdC (version alcaline)
- Version modifiée (+ FpG)



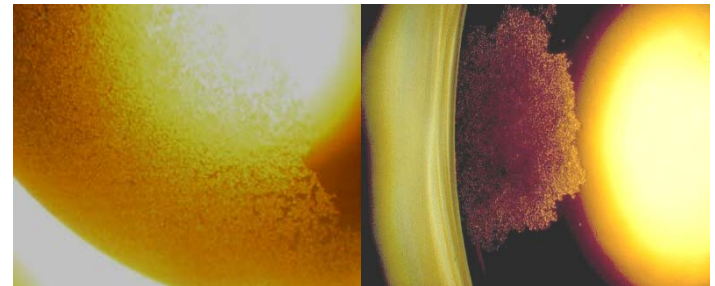
Aberrations chromosomiques (micronucleus OCDE 487)

- Test micronucleus avec Cyt-B (Lc H)
- Test micronucleus sans Cyt-B (16 HBE)



Mutations géniques

- Test MLA/TK (OCDE 476)



Génotoxicité *in vitro* : Systèmes cellulaires

Cellules pulmonaires humaines

- Cellules épithéliales bronchiques : Beas-2B, 16 HBE
- Cellules alvéolaires : A549

Cellules intestinales humaines

- Caco-2

Cellules de peau humaine

- Kératinocytes : NHEK
- RHE (TiO₂ & ZnO uniquement)

Cellules lymphatiques

- Lymphocytes primaires humains (MN uniquement)
- Cellules de lymphome de souris L5178Y (mutationsTK)



Génotoxicité *in vitro*

Résultats présentés durant la conférence finale
(22 Février 2013 - Paris)

Récapitulatif : Génotoxicité *in vitro* pour les TiO₂

Test Comètes :

Sur cellules pulmonaires : **Positif temps COURT** (et rutile > anatase) mais **négatif temps LONG**

Sur cellules Caco-2 : **Négatif temps COURT** mais **Positif temps LONG** (*dans la +part des cas*)

Sur cellules cutanées : **Tous** les TiO₂ **génétoxicques** sur **NHEK** mais **négatifs** sur **RHE**

(Pas d'absorption par le stratum corneum même après 72-h exposition – TEM)

Test du micronucleus : **Négatif** dans tous les types cellulaires sauf LcH (et rutile > anatase)

Récapitulatif : Génotoxicité *in vitro* pour les SiO₂

Test Comètes : **Positif temps COURT** mais **négatif temps LONG** pour cellules pulmonaires

Pas de ~~ce~~ temps COURT / temps LONG sur cellules Caco-2 (**Positif**)

Test du micronucleus : **Négatif** dans **tous les types cellulaires** sauf sur cellules **A549** (pour NM-201 et NM-202).

et sur cellules Caco-2, **Pas de reproductibilité**

SiO₂ - Test micronucleus *in vitro*

Organ of origin		Lung			Intestine	Blood
Tissue		Bronchial epithelial		Alveolar epithelial	Colon epithelial	Lymphocytes
Cell line or type		BEAS 2B	16HBE	A549	Caco-2	Primary
NM-200	(18 nm) 189 m ² /g	-	-	-/-	+ / -	-
NM-201	(18 nm) 140 m ² /g	-	-	+/+	+ / -	-
NM-202	(18 nm) 204 m ² /g	-	-	+/+	+ / -	-
NM-203	(25 nm) 204 m ² /g	(+)	-	-/(+)	+ / -	-

SiO₂ génotoxiques sur cellules intestinales mais pas reproductible

Récapitulatif : Génotoxicité *in vitro* pour les mwNTC

Test Comètes : **Négatif** temps LONG et COURT qq soit le type cellulaire

Test du micronucleus : **Positif** sur cellules bronchiques **BEAS 2B**, alvéolaires **A549** & intestinales **Caco-2**
Négatif sur cellules bronchiques **16HBE**

Variable sur lymphocytes

Questions / Remarques sur la génotoxicité *in vitro*

- Poids d'un test de lésions 1^{ères} ADN **Positif** et µnoyau **Négatif** :
 - ➔ Prédicativité du test des Comètes *in vitro* ?
- Pertinence d'un **temps LONG de traitement** pour le test des Comètes (dépendant du type cellulaire?)
- MoA lésions 1^{ères} ADN **négatif** et µnoyau **positif** ? Aneuploïdie?
Autres phénomènes (oxydation indirecte,...)?

Questions / Remarques sur la génotoxicité *in vitro*

1. Prédicativité du test des Comètes *in vitro* ?

- Tous les TiO₂ **Positifs** sur cellules **NHEK** & **Négatifs** sur cellules **16HBE**
- Pas d'absorption par le *stratum corneum* : Pertinence de l'utilisation des modèles de peau en 3D ?
- Interprétation quand **Positif** sur certaines cellules bronchiques (**Beas-2B**), mais **négatif** sur d'autres cellules pulmonaires (**16HBE**)?

→ Pose la question de la pertinence du type cellulaire

Caractérisation cellules indispensable

Questions / Remarques sur la génotoxicité *in vitro*

1. **Prédictivité du test des Comètes *in vitro* ?**
 2. **Caractérisation cellules indispensable**
 3. **Pb de reproductibilité (SiO₂) → Indispensable de réitérer les essais**
 4. **Place des tests standard (MLA/TK sur L5178Y) ?**
- **A-t-on un réel effet lié à l'état de cristallinité (TiO₂)?**
 - **SiO₂ : Pourquoi NM-201 et NM-202 Positifs et NM-200 et NM-203 Négatifs ?**

NM-200	18 nm / 189 m²/g
NM-201	18 nm / 140 m²/g
NM-202	18 nm / 204 m²/g
NM-203	25 nm / 204 m²/g

Ring test *in vitro*

3 NMs

- | | |
|---|--------|
| <input type="checkbox"/> TiO ₂ | NM-102 |
| <input type="checkbox"/> SiO ₂ | NM-203 |
| <input type="checkbox"/> mwCNTs | NM-403 |

2 lignées cellulaires

- BEAS 2B
- Caco-2

2 tests de génotoxicité

- Test des Comètes
- Test micronucleus (avec cytoB)

Round Robin tests *in vitro* : Résultats pour TiO2

Lignée Cellulaire	TiO2 NM-102	
	Test Comètes	Test micronucleus
Caco-2	+	-



1^{ère} phase

Round Robin tests *in vitro* : Résultats pour TiO2

Lignée Cellulaire	TiO2 NM-102	
	Test Comètes	Test micronucleus
Caco-2	+	-
Labo 1	-	-
Labo 5	+	
Labo 6	-	+
Labo 8	-	-
Labo 9		
Labo 13	+	
%tage de concordance / 1^{ère} phase	40%	66%

} 1^{ère} phase

} Ring Test

Round Robin tests *in vitro* : Résultats pour TiO2

Lignée Cellulaire	TiO2 NM-102	
	Test Comètes	Test micronucleus
Caco-2	+	-
Labo 1	-	-
Labo 5	+	
Labo 6	-	+
Labo 8	-	-
Labo 9		
Labo 13	+	
%tage de concordance / 1^{ère} phase	40%	67%
BEAS 2B	+	-
Labo 3	+	+
Labo 4	-	-
Labo 7	+	(+)
Labo 10	+	-
Labo 11	+	-
Labo 15	+	-
%tage de concordance / 1^{ère} phase	83%	67%

} 1^{ère} phase

} Ring Test

} 1^{ère} phase

} Ring Test

Round Robin tests *in vitro* : Résultats pour SiO₂

Lignée Cellulaire	SiO ₂ NM-203	
	Test Comètes	Test micronucleus
Caco-2	+	+ / -
Labo 1	-	+
Labo 5	+	+
Labo 6	-	-
Labo 8	+	-
Labo 9		-
Labo 13	-	+
%tage de concordance / 1 ^{ère} phase	40%	? (50 %)
BEAS 2B	(+)	(+)
Labo 3	-	+
Labo 4	+	-
Labo 7	+	+
Labo 10	+	-
Labo 11	-	+
Labo 15	-	-
%tage de concordance / 1 ^{ère} phase	? (50%)	? (50 %)

} 1^{ère} phase

} Ring Test

} 1^{ère} phase

} Ring Test

Round Robin tests *in vitro* : Résultats pour mwCNTs

Lignée Cellulaire	mwCNTs NM-403	
	Test Comètes	Test micronucleus
Caco-2	–	(+)
Labo 1	–	+
Labo 5	+	+
Labo 6	–	+
Labo 8	–	–
Labo 9		–
Labo 13	–	(+)
%tage de concordance / 1 ^{ère} phase		
	80%	17 %
BEAS 2B	–	+
Labo 3	+	+
Labo 4	–	–
Labo 7	+	–
Labo 10	–	–
Labo 11	–	–
Labo 15	+	–
%tage de concordance / 1 ^{ère} phase		
	50%	17%

1^{ère} phase

Ring Test

1^{ère} phase

Ring Test

Génotoxicité *in vitro* : Conclusions Générales

- Pb de **reproductibilité** (intra et inter – labs) : La préparation de la dispersion affecte la taille des agglomérats → sédimentation → exposition cellules → cytotoxicité → choix des doses → génotoxicité
- Lignées cellulaires :
 - Capables d'internaliser (et **externaliser!**) les NMs peuvent être utilisées pour évaluer la génotoxicité → **Caractérisation indispensable**
 - Conditions de culture (+/- protéines), état des cellules,...
 - Modèles peau 3D non recommandés pour évaluation génotoxicité
- Systèmes expérimentaux
 - Utilisation du test comètes? Temps de Tmt optimal?
 - Le test MLA/TK négatif pour tous les NMs
- Résultats : Certains NMs → légère activité génotoxique *in vitro* :
 - Mécanismes indirects ?
 - Possibilité d'effets à faibles doses (à confirmer)



Génotoxicité *in vivo* - Objectifs

Déterminer la génotoxicité *in vivo* de MNs
Comparaison *in vitro* / *in vivo*

Etudes chez le rat

4-5 animaux/dose

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



Comptage cellules
broncho-alvéolaires
Histologie
Test Comètes modifié

Inflammation &
stress oxydant

3-6 h après la dernière
administration

Micronucleus assay

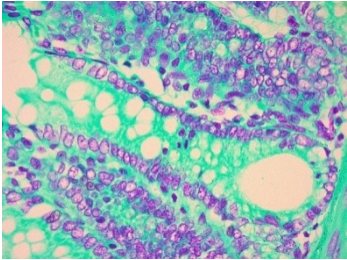
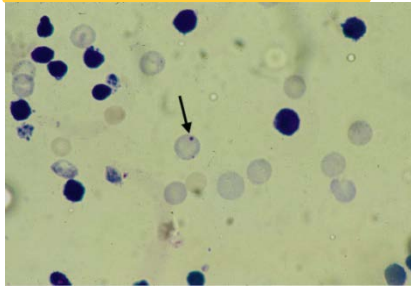
Comet assay +/- FpG

Moelle osseuse
(OECD 474)

Chi-
square
test

Colon
(gavage)

Poumon, LBA, foie, rate,
sang, moelle osseuse, rein,
intestin, colon



Non parametric
Kruskal-Wallis test

Slide par Valérie Fessard

- TiO2: 4.6, 2.3 and 1.15 mg/kg (x3) instillation 26, 13.5, 6.5 mg/kg (x3) gavage 2.3 mg/animal (X5) NM103 and 104 intravenous (WP7) 10 and 15 mg/kg (x2) NM102 intravenous (LacZ)
- SAS: 12, 6 and 3 mg/kg (x3) instillation 20, 10 and 5 mg/kg (x3) gavage and NM203 intravenous
- CNT: 51.2, 25.6 and 12.8 mg/kg (x 3) for gavage except for NM400 (12.8, 6.4, 3.2 mg/kg (x3)) 0.4, 0.2 and 0.1 mg/kg (x3) for instillation except for NM402 (1.6, 0.8 and 0.4 mg/kg (x3))



Génotoxicité *in vivo*

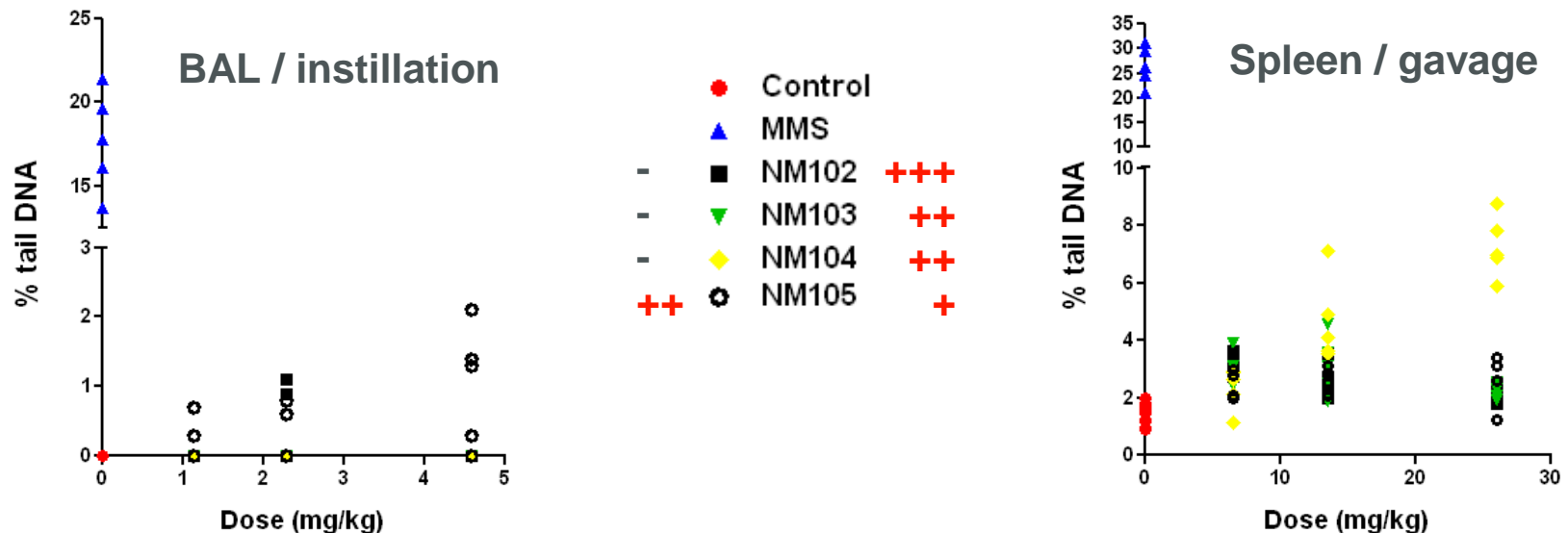
**Résultats présentés durant la conférence finale
(22 Février 2013 - Paris)**

Génotoxicité *in vivo* - Résultats pour TiO₂

- Test des Comètes :

Les TiO₂ n'induisent pas d'augmentation significative de la fragmentation ADN quel que soit l'organe **excepté**

- Après **instillation** du NM105 au niveau du LBA
- Après **gavage** au niveau rate, intestin (NM103), colon (NM102 & 104) et moelle osseuse (NM104)



Génotoxicité *in vivo* - Résultats pour TiO₂

- Test du micronucleus (moelle osseuse) :

Aucune induction significative du Nb de MN quelle que soit la voie d'administration (instillation, gavage ou I.V)

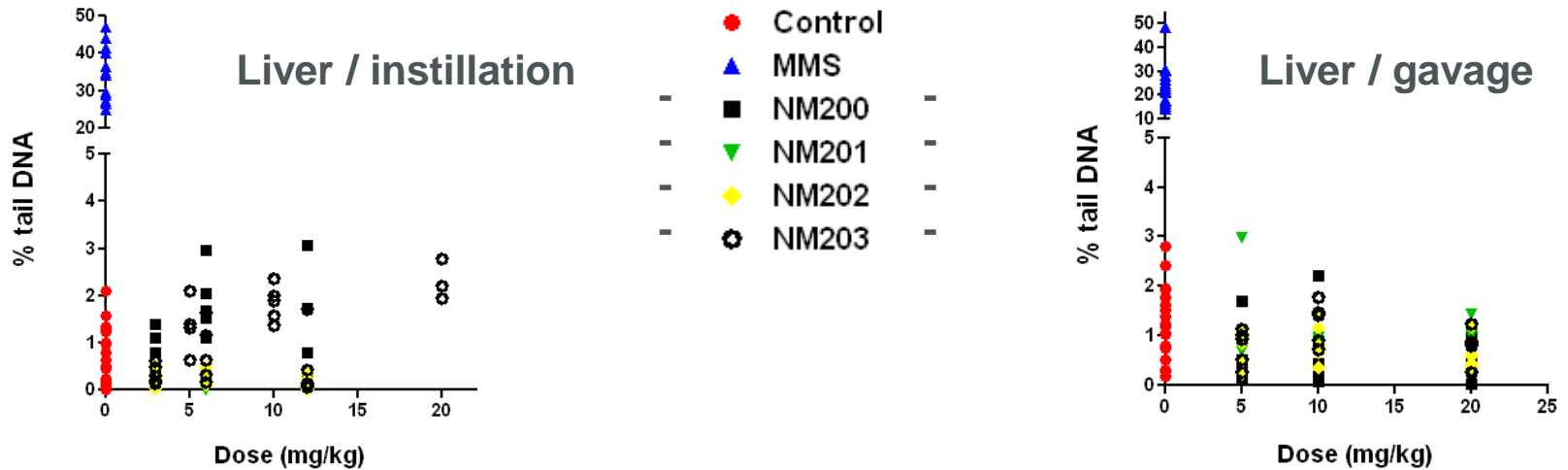
- Inflammation:

Tous les TiO₂ : augmentation dose-dépendante neutrophiles LBA

Génotoxicité *in vivo* - Résultats pour SiO₂

- Test des Comètes :

Pas d'augmentation significative de fragmentation ADN quels que soit l'organe et la voie d'administration



Génotoxicité *in vivo* - Résultats pour SiO₂

- Test du micronucleus :

- **Moelle osseuse** :

Aucune induction significative du Nb de MN quelle que soit la voie d'administration

- **Colon** :

Augmentation du nombre de micronoyaux pour NM202 & NM203 uniquement à la plus faible dose (5 mg/kg/j)

- Inflammation :

Tous les SiO₂ → augmentation dose-dépendante du nb de neutrophiles LBA

Génotoxicité *in vivo* - Résultats pour mwCNTs

- Test des Comètes :

Quelques augmentations significatives de fragmentation ADN au niveau de certains organes :

- Après **gavage** pour le NM401 au niveau du **foie** et du **rein**
- Après **instillation**, au niveau du **rein**, **rate**, **LBA** selon le NM

- Test du micronucleus :

- **Moelle osseuse:**
 - Aucun effet significatif
 - Quelle que soit la voie d'administration
- **Colon:**
 - Aucun effet significatif avec NRCWE 006

Génotoxicité *in vivo* : Conclusions

- **Variabilité** des effets toxiques des NMs d'une **même famille** (génotoxicité et signes de tox)
 - La plupart des données indique une **absence de génotoxicité**
 - Quelques effets génotoxiques observés ds qq organes (≠ selon la voie d'exposition) sans réelle RDE → **Nécessité de confirmer**
 - **Peu d'effet** lié à l'**oxydation** due à l'exposition aux NMs d'après mesure dans le test des comètes modifié (+ Fpg)
 - **Résultats négatifs** pour **MN sur moelle osseuse**
- ➔ **Tentatives de** 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
TiO₂	NM-102	-	+	+	-	+	-	-	+	-
	NM-103	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NM-104	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NM-105	-	-	-	-	-	+	-	+	-
SiO₂	NM-200	-	+		-	+	-	-/-	(+)	-
	NM-201	-	(+)		-	-	-	+ / +	+	(+)
	NM-202	-	+		-	-	-	+ / +	+	(+)
	NM-203	(+)	+		-	-	-	- / (+)	-	+
mw NTC	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	
TiO₂	NM-102	-	+	+	-	+	-	-	+	-	- / -	
	NM-103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- / -	
	NM-104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- / -	
	NM-105	-	-	-	-	-	+	-	+	-	- / ++	
SiO₂	NM-200	-	+		-	+	-	- / -	(+)	-	- / -	
	NM-201	-	(+)		-	-	-	+/+	+	(+)	- / -	
	NM-202	-	+		-	-	-	+/+	+	(+)	- / -	
	NM-203	(+)	+		-	-	-	- / (+)	-	+	- / -	
mw NTC	NM-400	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	- / -	
	NM-401	+	-	-	-	-	-	-	-	-	- / +	
	NM-402	+	-	-	-	-	-	+	-	-	- / -	
	NRCWE-006	+	-	-	-	-	-	+	-	-	- / (+)	

Organes cibles : Colon & sang

		Caco-2			HuLy	Comet <i>in vivo</i>	
		μnucleus	Comet		μnucleus	Côlon	Sang
			3 h	24h			
TiO₂	NM-102	-	-	+		+	
	NM-103	-	-	(+)		++	
	NM-104	-	-	-		+	
	NM-105	-	-	+		-	
SiO₂	NM-200	+ / -	+	+		-	
	NM-201	+ / -	-	(+)		-	
	NM-202	+ / -	(+)	(+)		-	
	NM-203	+ / -	+	+		-	
mWCNT	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			
TiO₂	NM-102	-	-	+	(+)	+	-
	NM-103	-	-	(+)	+	++	-
	NM-104	-	-	-	+	+	-
	NM-105	-	-	+	-	-	-
SiO₂	NM-200	+ / -	+	+	-	-	-
	NM-201	+ / -	-	(+)	-	-	-
	NM-202	+ / -	(+)	(+)	-	-	-
	NM-203	+ / -	+	+	-	-	-
mWCNT	NM-400	(+)	-	-	-	-	-
	NM-401	+	-	-	-	-	-
	NM-402	+	-	-	(+)	-	-
	NRCW E-006	-	-	-	+	-	-

Conclusions sur corrélation *in vitro* / *in vivo*

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

→ Test du micronucleus *in vitro* le plus prédictif

Mais pas de comparaison possible pour rate, foie et rein pour lesquels des réponses positives *in vivo* ont été observées...

→ Intéressant de tester *in vitro* sur macrophages, hépatocytes, cellules rénales et splénocytes dans le test du micronucleus

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 ≠ 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* ? → Toxicocinétique cruciale**

Conclusions sur corrélation *vitro* / *vivo*

Vivo + / vitro –

- Les tests *in vitro* sont-ils capables de MeE **génétoxicité secondaire** ?
- 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? **Absorption de NPs doit être démontrée**

- Test du micronucleus *in vivo* sur M.O.

- Détecte les substances génotoxiques systémiques

- Doses élevées de NMs dans la M.O. 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, nov 2013 – Paris, octobre 2014)

Conclusions générales

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

- **Stratégie basée sur tests réglementaires ?**
- **Prédictivité des résultats 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 générales

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



Merci pour votre attention

Fabrice.nesslany@pasteur-lille.fr