

Institut Pasteur de Lille

Évaluation du risque des nanomatériaux :

Nouvelles approches

Dr Fabrice NESSLANY

Chef du service de toxicologie génétique

Institut Pasteur de Lille

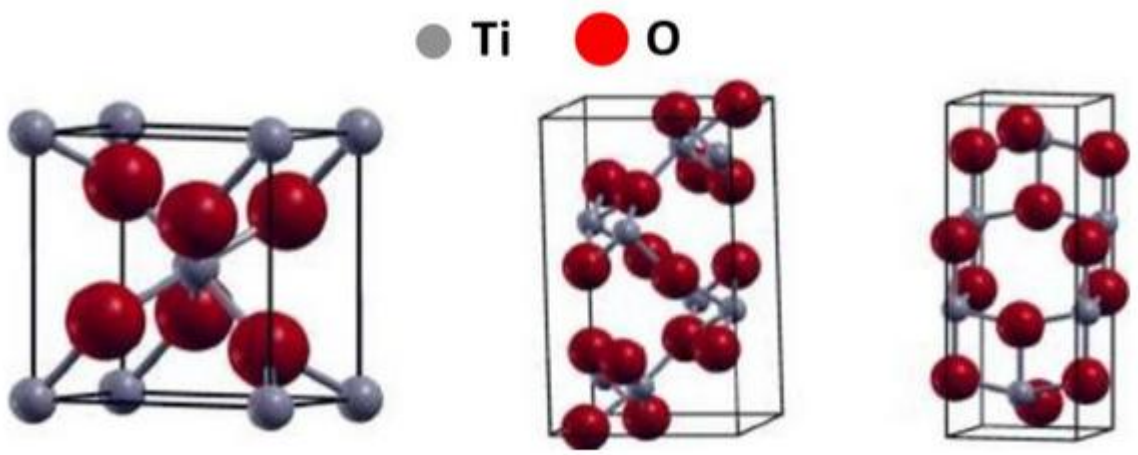
Fondation reconnue d'utilité publique

Comment réaliser une évaluation des risques?

❖ **Chaque NM semble particulier :**

✓ Nombreuses déclinaisons de NMs à partir d'une « même » substance

- Pour des NMs de « même » composition, nombreuses déclinaisons (**cristallinité**, taille, forme, traitement de surface, enrobage, fonctionnalisation,…)

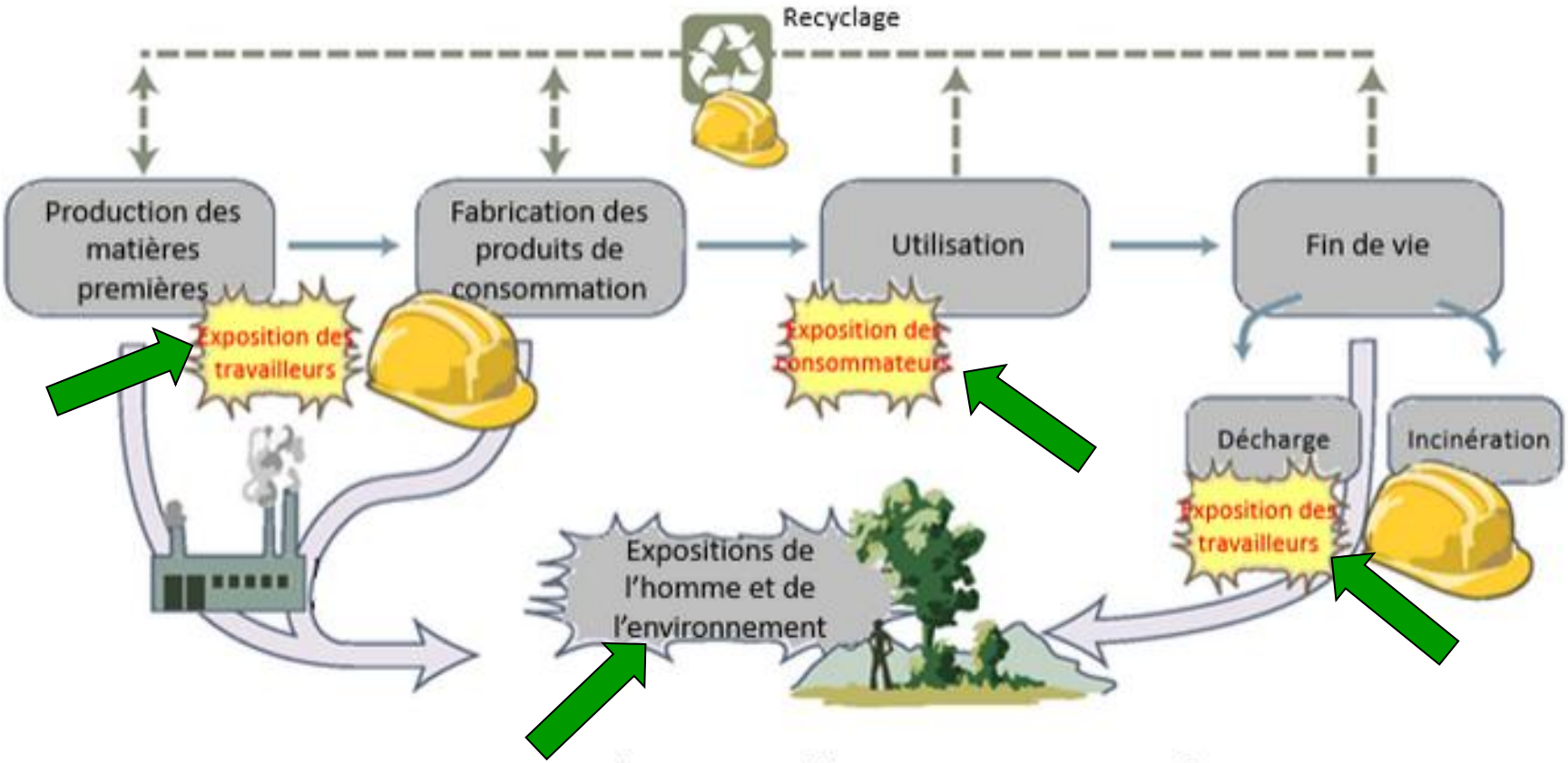


Différentes formes polymorphiques du dioxyde de titane
(de gauche à droite : **rutile**, brookite et **anatase**)

Armand Kanjer

Comment réaliser une évaluation des risques?

- **Chaque NM semble particulier :**
  - ✓ Nombreuses déclinaisons de NMs à partir d'une « même » substance
  - ✓ Evolution de ces matériaux tout au long de leur **cycle de vie**.



Cycle de vie des nanomatériaux manufacturés [National Nanotechnology Initiative].

Comment réaliser une évaluation des risques?

- **Chaque NM semble particulier :**
  - ✓ Nombreuses déclinaisons de NMs à partir d'une « même » substance
  - ✓ Evolution de ces matériaux tout au long de leur **cycle de vie**.
- **Concernant l'exposition aux produits contenant des NMs**
  - ✓ Traçabilité des produits de consommation contenant des NMs?

Le cadre réglementaire actuel n'est pas capable de traiter efficacement toutes les **variations multidimensionnelles** des NM au cas par cas (temps, adaptabilité,…).

Evaluation des risques spécifiques

Depuis quelques années, nombreuses initiatives pour des approches ERS nano-spécifiques

Organisations/Agences

- **SCENHIR** (2007),
- **RIVM** (2015),
- **ECETOC** (DF4nanoGrouping, 2015)[a],
- **ECHA** (2016), ...
- **ANSES**

  → « *Control Banding* »

Projets de recherche européens

- **SRU** (German Advisory Council on the Environment, 2011),
- **ITS-NANO** (Intelligent Testing Strategy for Engineered Nanomaterials, 2012-2013)
- **SUN** (SUstainable Nanotechnologies, 2013-2017),
- **GUIDEnano** (2013 - 2017),
- **MARINA**[b]

[a] : *European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) Nano Task Force Arts et al. Regulatory Toxicology and Pharmacology 71 (2015)*

[b] : *Peter M. J. Bos et al, Int. J. Environ. Res. Public Health 2015, 12, 15007–15021*

Comment réaliser une évaluation des risques?

Pour être efficace, l'approche ERS doit se concentrer sur les éléments qui pourraient conduire à la plus forte exposition et/ou à la toxicité la plus élevée

➔ Approche guidée par l'exposition, pilotée par le potentiel toxique et focalisée sur les questions.

➔ L'approche doit pouvoir être appliquée tout au long du cycle de vie d'un NM, depuis le développement (incluant le safe by design) jusqu'à son élimination.

Evaluation des risques spécifiques

Depuis quelques années, nombreuses initiatives pour des approches ERS nano-spécifiques

Organisations/Agences

- SCENHIR (2007),
- RIVM (2015),
- ECETOC (DF4nanoGrouping, 2015)[a],
- ECHA (2016), ...
- ANSES

→ « *Control Banding* »

Projets de recherche européens

- SRU (German Advisory Council on the Environment, 2011),
- ITS-NANO (Intelligent Testing Strategy for Engineered Nanomaterials, 2012-2013)
- SUN (SUstainable Nanotechnologies, 2013-2017),
- GUIDEnano (2013 - 2017),
- MARINA[b]

NanoReg[1] & Document guide de l'EFSA 2018

[a] : *European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) Nano Task Force Arts et al. Regulatory Toxicology and Pharmacology 71 (2015)*

[b] : *Peter M. J. Bos et al, Int. J. Environ. Res. Public Health 2015, 12, 15007–15021*

EFSA Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain (adopté le 29 mai 2018)

Caractérisation physico-chimique **(Chap 4)**

Le matériau est-il un NM? *Selon la recommandation de définition de la Commission européenne datée du 18 octobre 2011*

Non

Caractéristique de la nanoéchelle

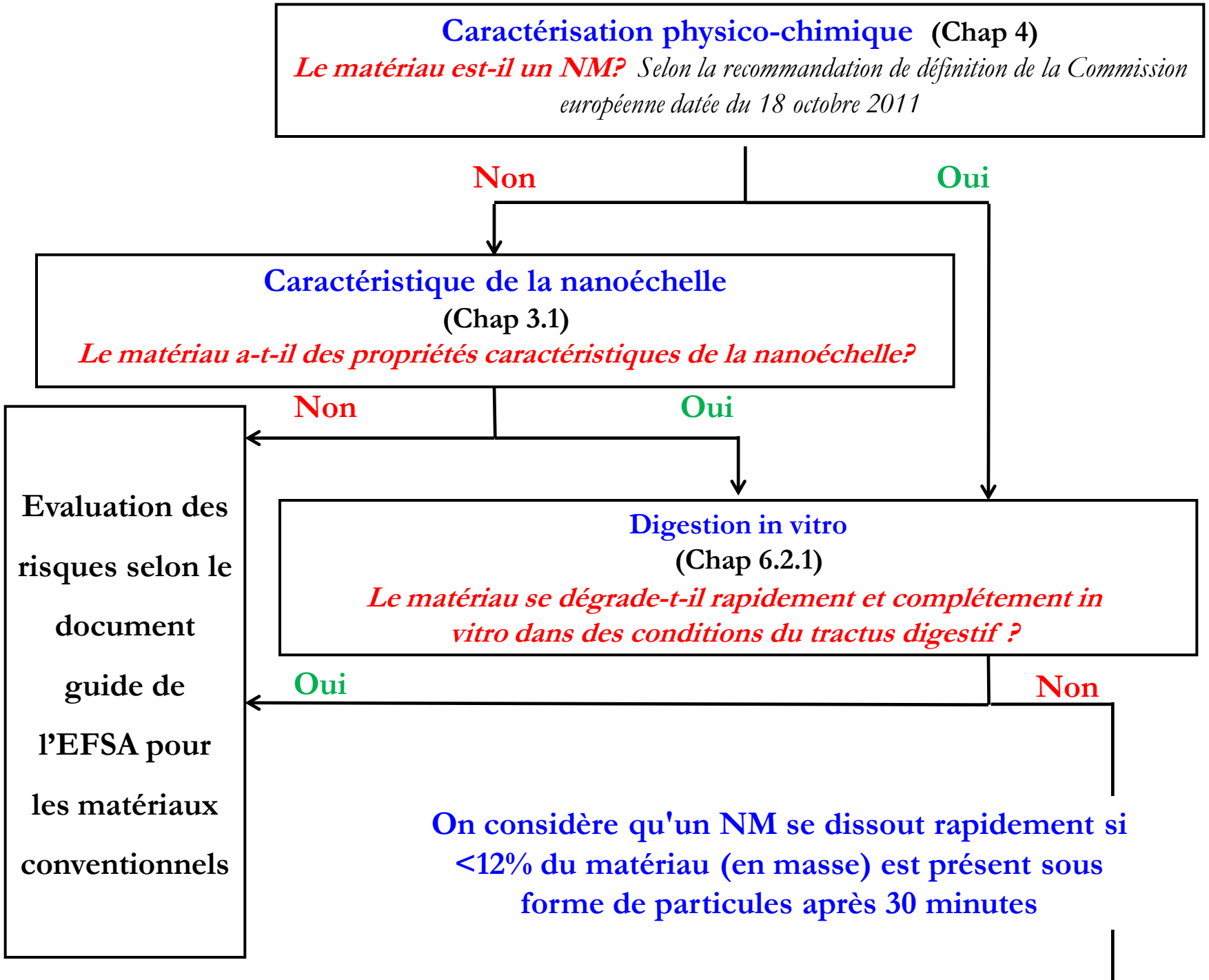
(Chap 3.1)

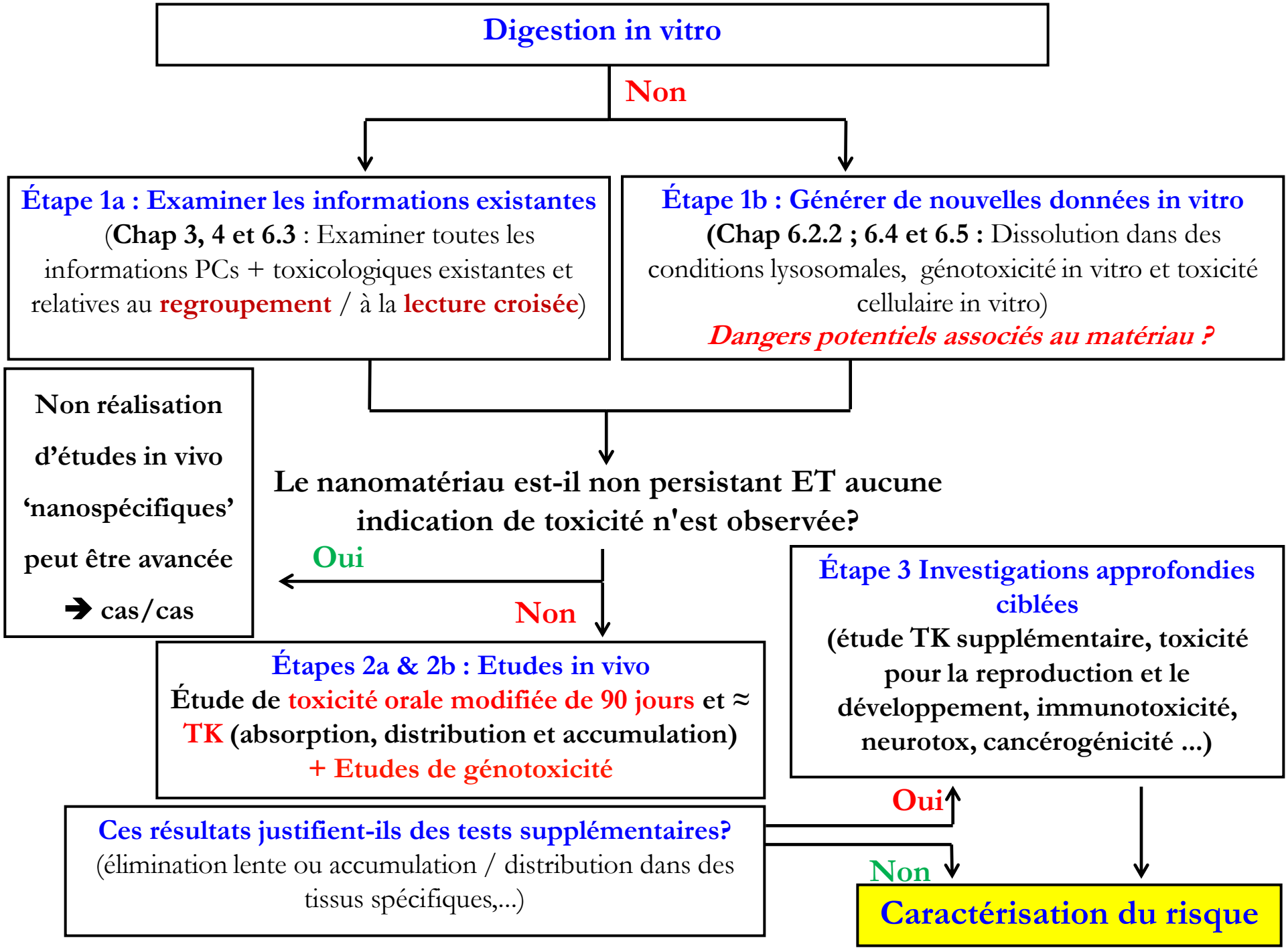
Le matériau a-t-il des propriétés caractéristiques de la nanoéchelle?

Entreraient dans le champ d'application, les matériaux :

- qui répondent aux critères de définition des NM mani[illegible]s dans le règlement (UE) 2015/2283 (« **novel** [illegible] 1169/2011 (**INCO**) et autres mat[illegible] a 100 nm si propriétés caract[illegible]
- qui ne sont p[illegible] une fraction de particules < 50% [illegible] avec une ou plusieurs dimensions [illegible]m,
- [illegible]anométrique faites de **matériaux naturels** qui ont été dé[illegible] **produits pour avoir des propriétés nano-actives**, ou qui ont été mo[illegible]ées pour être utilisées dans le développement d'autres matériaux à l'échelle nanométrique (par ex. pour encapsuler des composés, i.e. bioactifs).

Ne reprend pas la recommandation de définition de la Commission européenne datée du 18 octobre 2011 (seuil de 50 % en nombre de particules < 100 nm)


Caractérisation physico-chimique (Chap 4)
Le matériau est-il un NM? Selon la recommandation de définition de la Commission européenne datée du 18 octobre 2011
Non
Oui
Caractéristique de la nanoéchelle
(Chap 3.1)
Le matériau a-t-il des propriétés caractéristiques de la nanoéchelle?
Non
Oui
Evaluation des risques selon le document guide de l'EFSA pour les matériaux conventionnels
Digestion in vitro
(Chap 6.2.1)
Le matériau se dégrade-t-il rapidement et complétement in vitro dans des conditions du tractus digestif ?
Oui
Non
On considère qu'un NM se dissout rapidement si <12% du matériau (en masse) est présent sous forme de particules après 30 minutes


Digestion in vitro
Non
Étape 1a : Examiner les informations existantes
(Chap 3, 4 et 6.3 : Examiner toutes les informations PCs + toxicologiques existantes et relatives au regroupement / à la lecture croisée)
Étape 1b : Générer de nouvelles données in vitro
(Chap 6.2.2 ; 6.4 et 6.5 : Dissolution dans des conditions lysosomales, génotoxicité in vitro et toxicité cellulaire in vitro)
Dangers potentiels associés au matériau ?
Non réalisation d'études in vivo 'nanospécifiques' peut être avancée
➔ cas/cas
Le nanomatériau est-il non persistant ET aucune indication de toxicité n'est observée?
Oui
Non
Étape 3 Investigations approfondies ciblées
(étude TK supplémentaire, toxicité pour la reproduction et le développement, immunotoxicité, neurotox, cancérogénicité ...)
Étapes 2a & 2b : Etudes in vivo
Étude de toxicité orale modifiée de 90 jours et ≈ TK (absorption, distribution et accumulation)
+ Etudes de génotoxicité
Oui
Ces résultats justifient-ils des tests supplémentaires?
(élimination lente ou accumulation / distribution dans des tissus spécifiques,...)
Non
Caractérisation du risque

Modifications et/ou adaptations méthodologiques

Très grand nombre de NM :

- Disponibilité des données pour chacune des formes (même très proche)??? Quel sens?

→ Peut-on établir des « ponts » entre les données de différents NM considérés comme proches ?

- Les comportements (éco)toxicologiques & cinétique dépendent des paramètres P-C mais jusqu'à quel point?

→ Intérêt +++ pour évaluation des risques

→ Comment ?

Comment établir des « ponts » entre les différentes nanoformes?

- Grouping = Constitution de catégories de NMs

Sur quels critères ? (composition, comportement/réactivité, dangers, cycle de vie, ...)

- Read-across

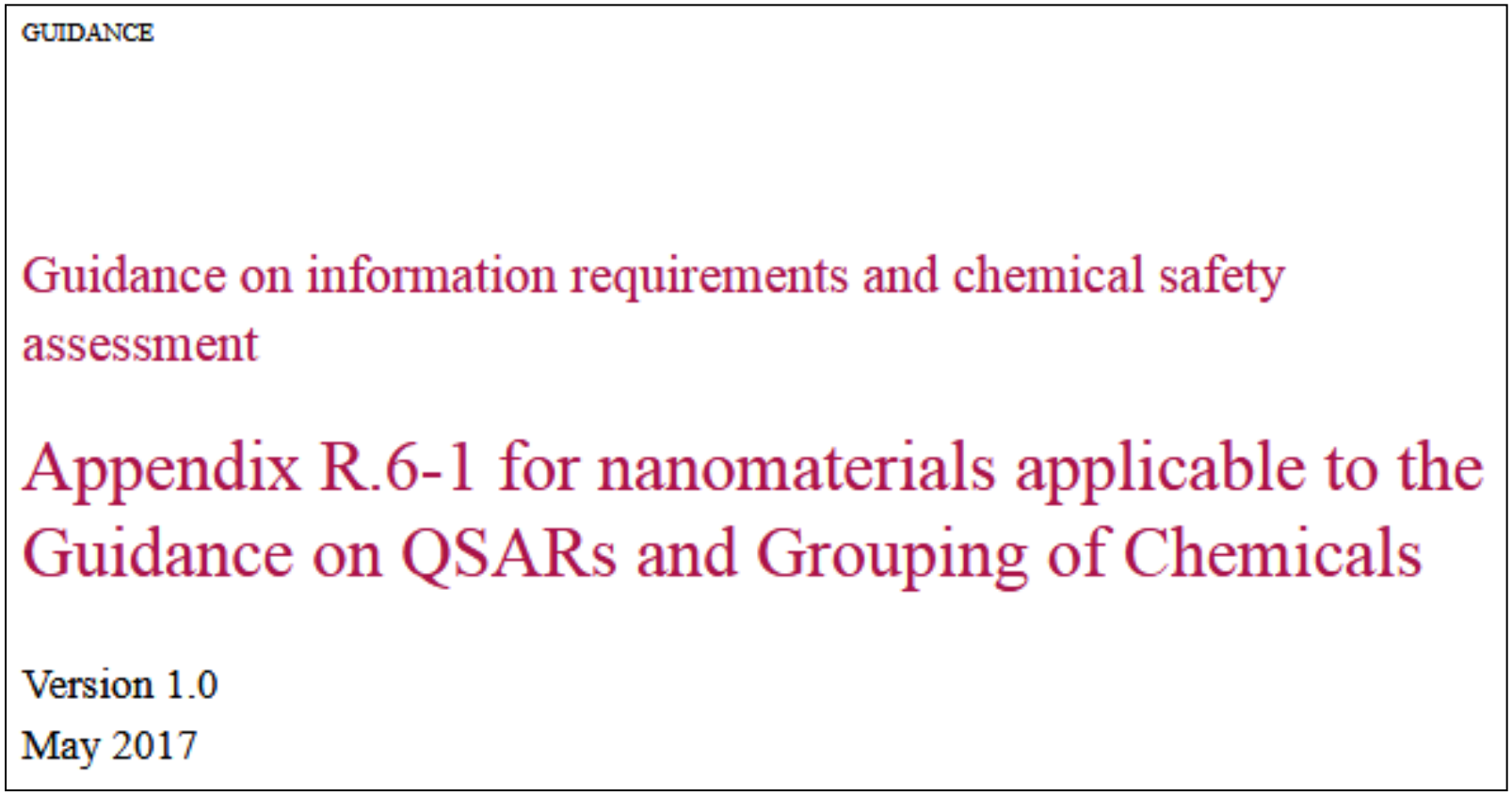
=Utiliser données (éco)toxicologiques pour combler les manques de données et regrouper les nanoformes d'une même catégorie

- Développement d'outils et de nouvelles approches pour une évaluation nano-spécifique des risques : *Safe(r) by design, QSAR, H-D, etc...*

- Prioriser** les actions : **Ranking

➔ Stratégie pour utilisation de données entre les nanoformes (ECHA, 2016, 2017)

Utilisation de données (éco)toxicologiques pour combler les manques de données et regrouper les nanoformes.


GUIDANCE

Guidance on information requirements and chemical safety assessment

Appendix R.6-1 for nanomaterials applicable to the Guidance on QSARs and Grouping of Chemicals

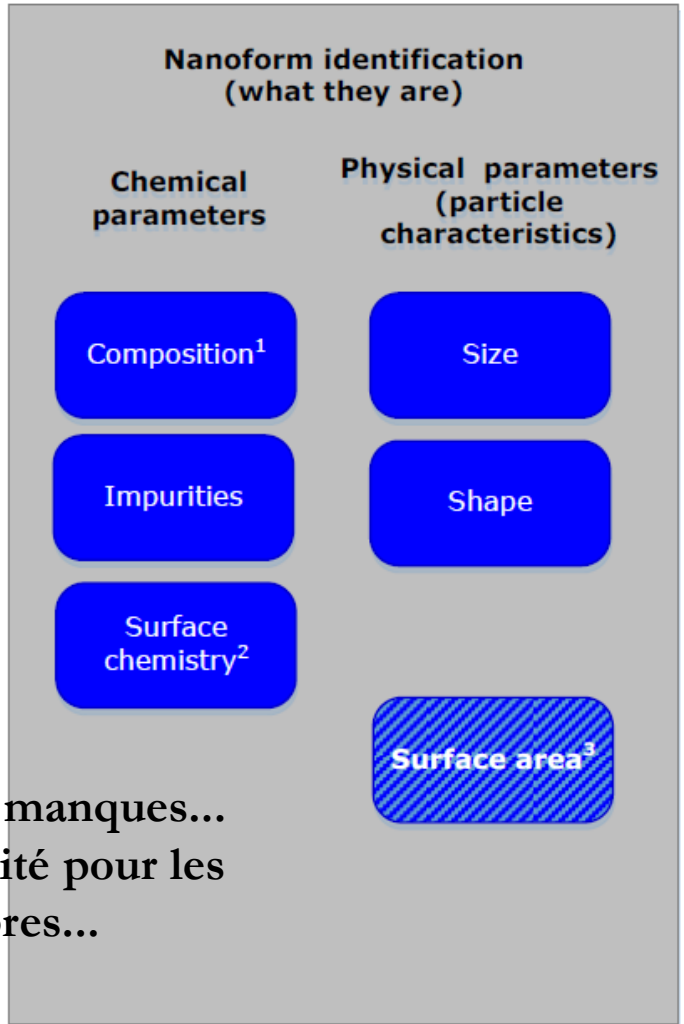
Version 1.0
May 2017

Substance

Identification of the nanoforms

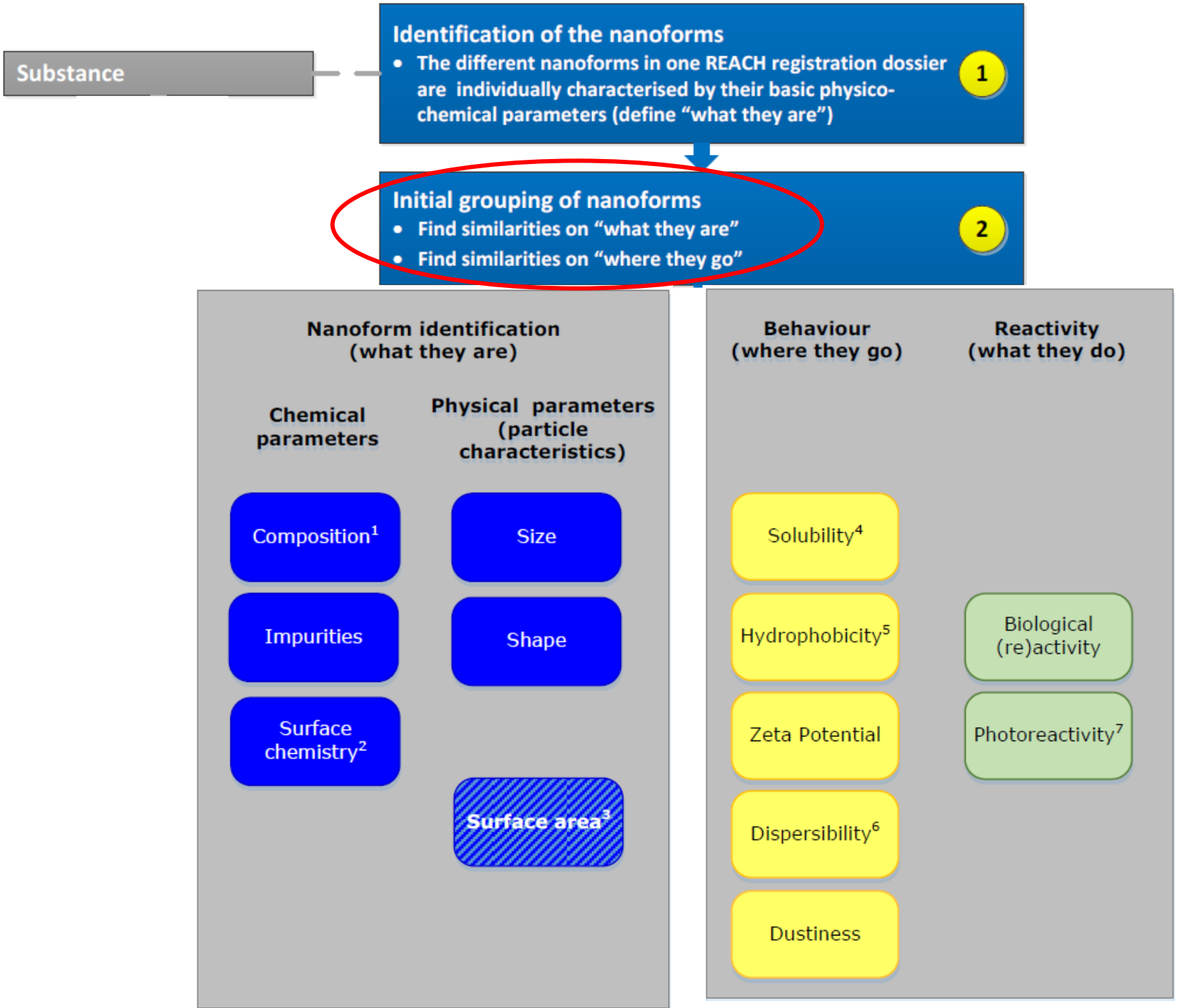
- The different nanoforms in one REACH registration dossier are individually characterised by their basic physico-chemical parameters (define "what they are")

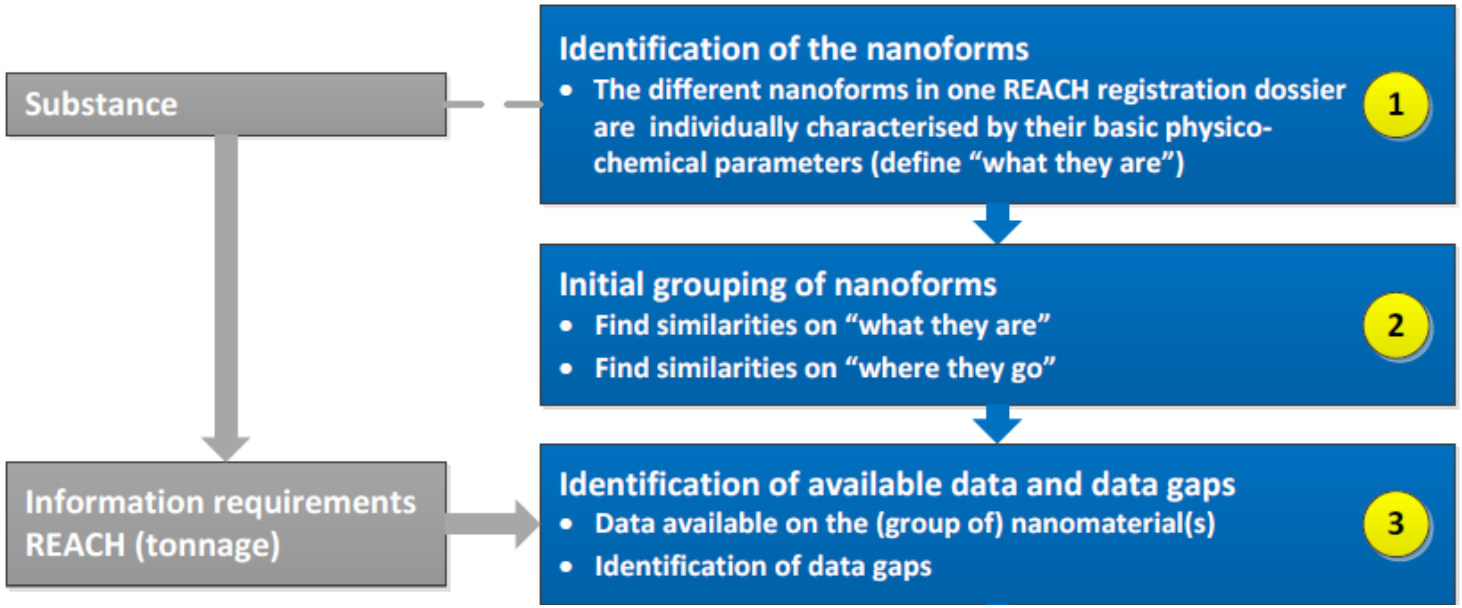
1

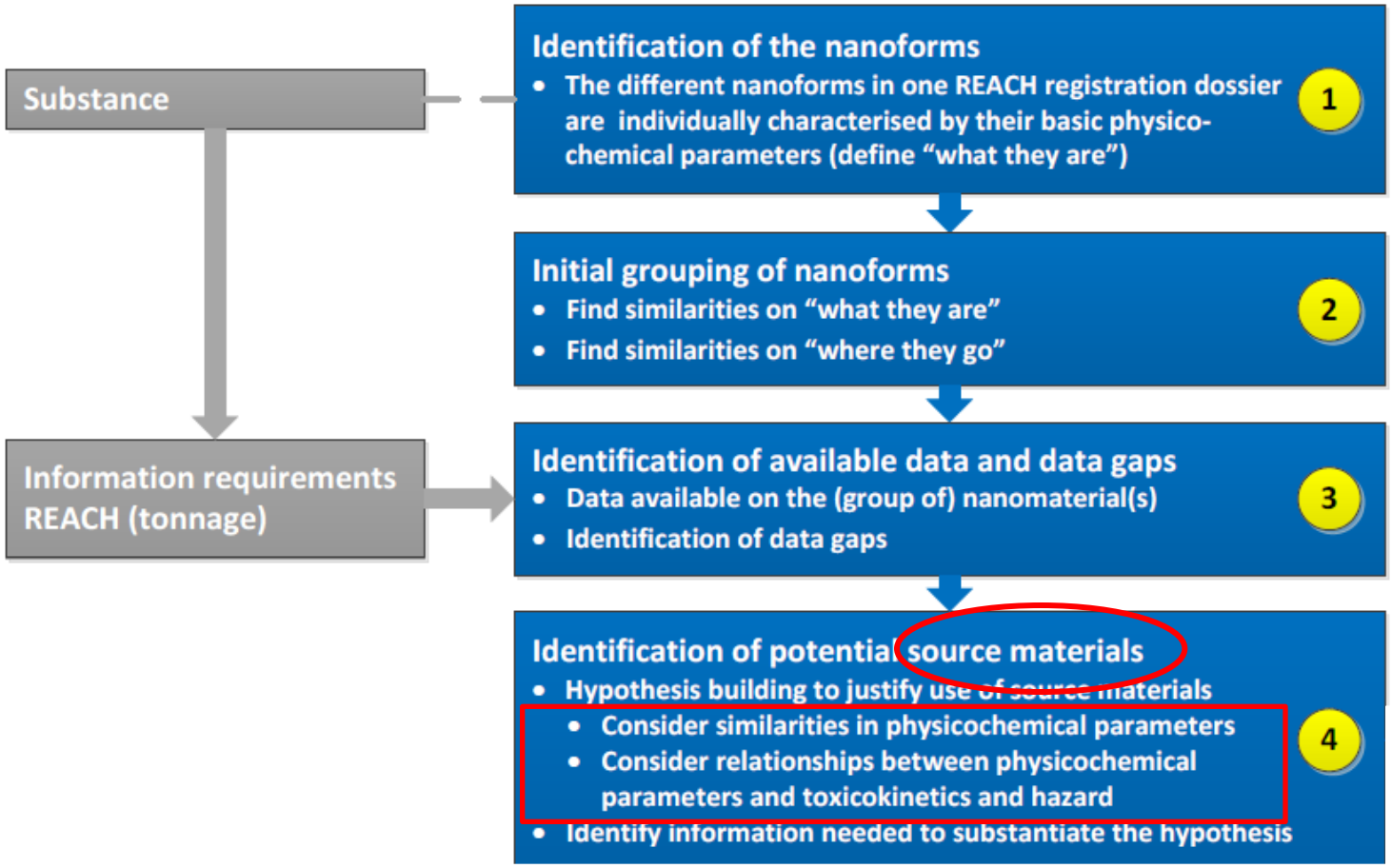




Certains manques…
Ex. rigidité pour les fibres…


Substance
Identification of the nanoforms
• The different nanoforms in one REACH registration dossier are individually characterised by their basic physico-chemical parameters (define "what they are")
1
Initial grouping of nanoforms
• Find similarities on "what they are"
• Find similarities on "where they go"
2
Nanoform identification (what they are)
Chemical parameters
Physical parameters (particle characteristics)
Composition[1]
Size
Impurities
Shape
Surface chemistry[2]
Surface area[3]
Behaviour (where they go)
Reactivity (what they do)
Solubility[4]
Hydrophobicity[5]
Zeta Potential
Dispersibility[6]
Dustiness
Biological (re)activity
Photoreactivity[7]


Substance
Identification of the nanoforms
The different nanoforms in one REACH registration dossier are individually characterised by their basic physico-chemical parameters (define "what they are")
1
Initial grouping of nanoforms
Find similarities on "what they are"
Find similarities on "where they go"
2
Information requirements REACH (tonnage)
Identification of available data and data gaps
Data available on the (group of) nanomaterial(s)
Identification of data gaps
3

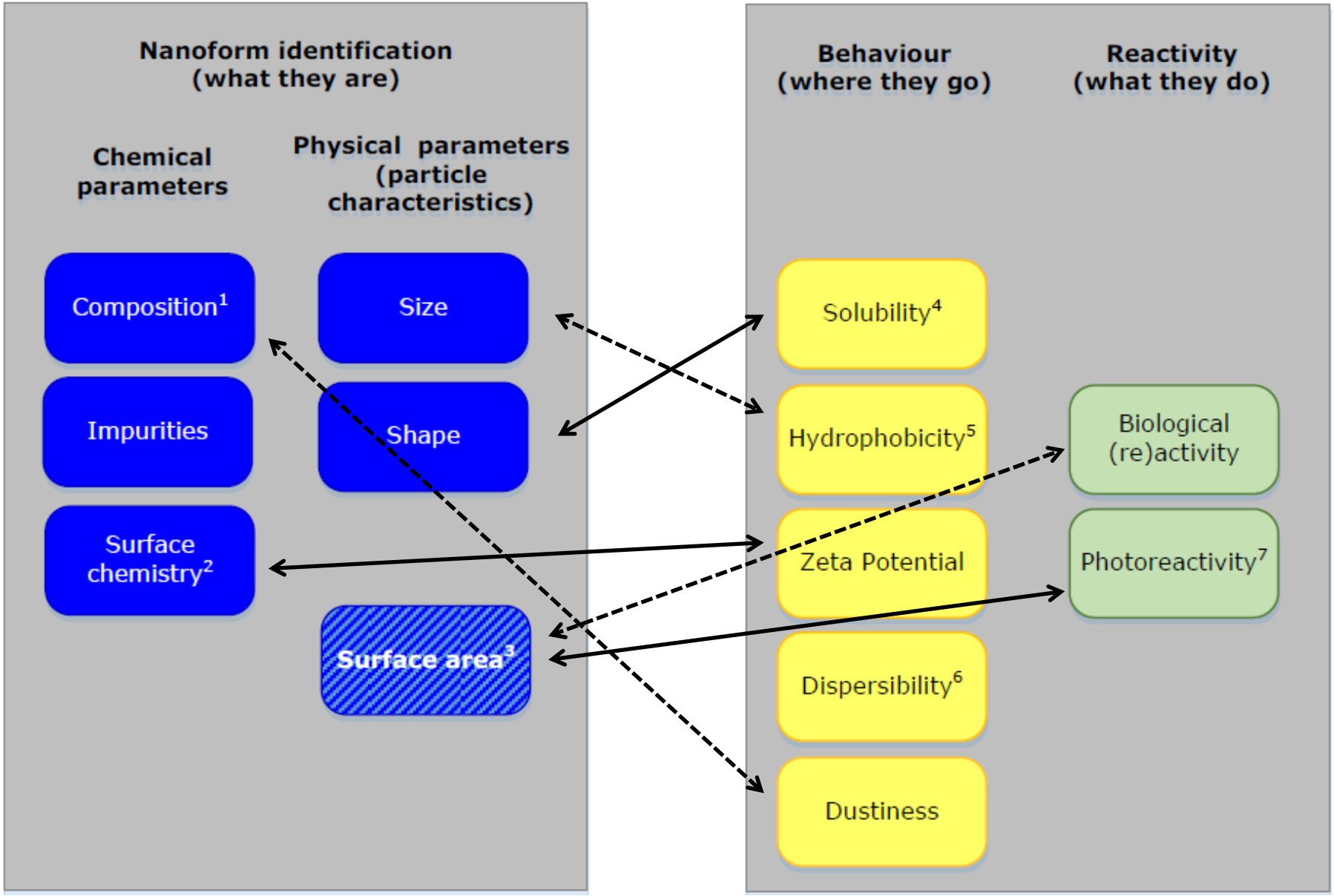


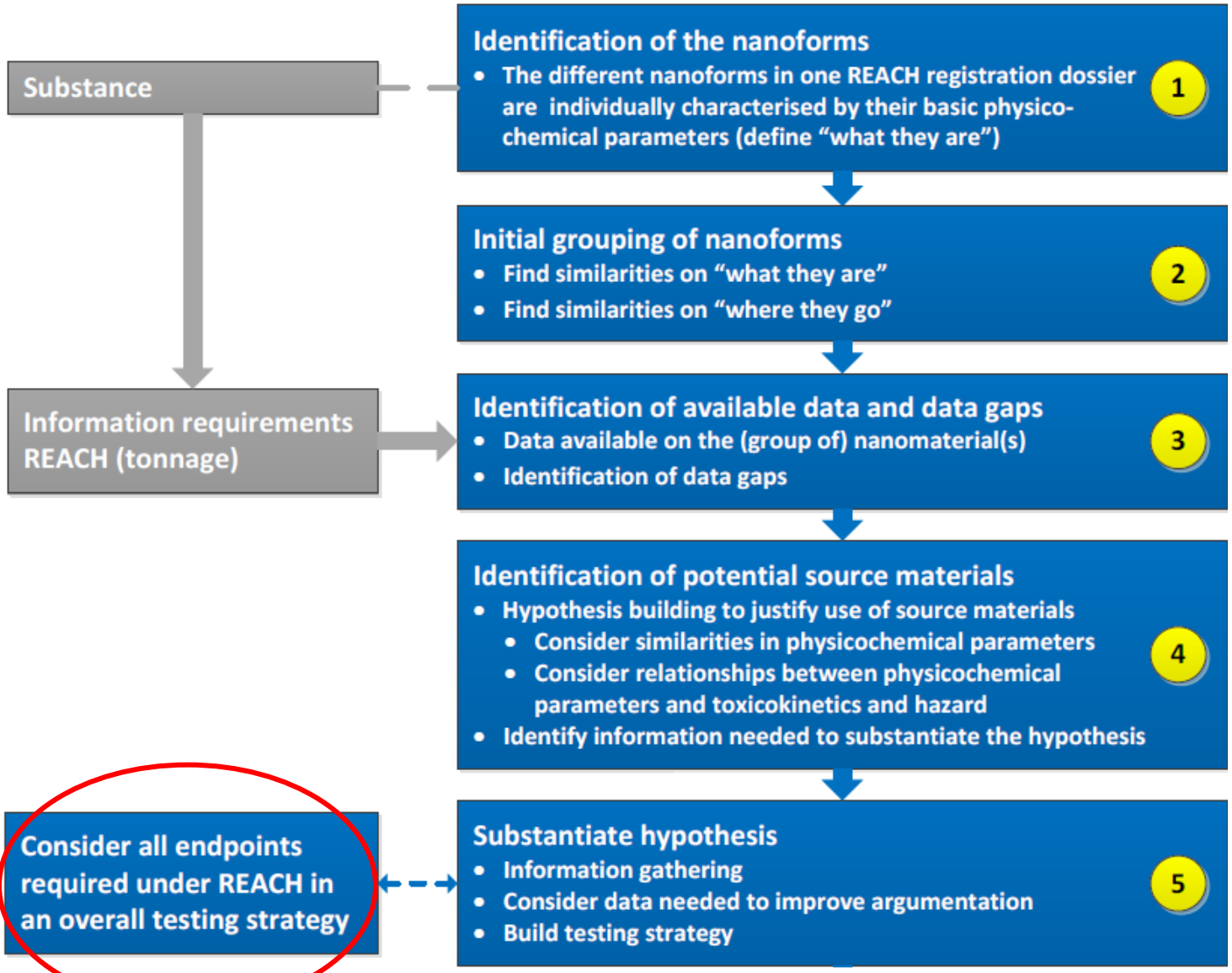
➔ Identifier les matériaux sources potentiels

➔ Considérer les similarités **&** relation entre paramètres P-C, TK, dangers

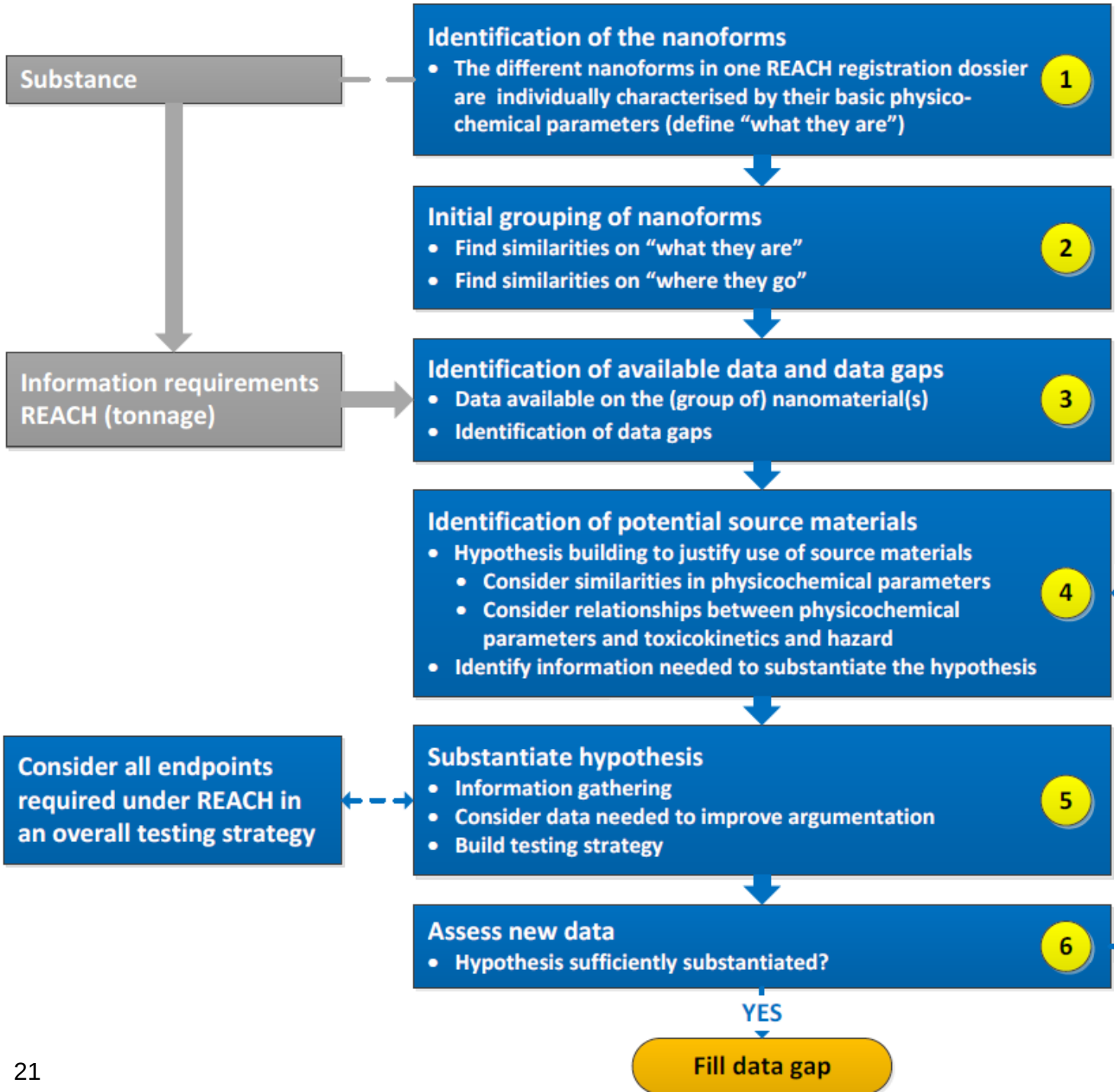
Expliquer pourquoi les similitudes ou les différences de propriétés physico-chimiques entre les nanoformes permettent de prédire des comportements (éco)toxicologiques spécifiques

➔ Considérer les similarités & la relation entre paramètres P-C, TK & dangers





➔ **Justifier l'hypothèse** (paramètres tox par paramètre tox), basé sur l'assurance que **le NM atteint moins le site cible** (argument TK) et qu'**il est moins dangereux** (argument de risque)


Substance
Information requirements REACH (tonnage)
Consider all endpoints required under REACH in an overall testing strategy
Identification of the nanoforms
The different nanoforms in one REACH registration dossier are individually characterised by their basic physico-chemical parameters (define "what they are")
1
Initial grouping of nanoforms
Find similarities on "what they are"
Find similarities on "where they go"
2
Identification of available data and data gaps
Data available on the (group of) nanomaterial(s)
Identification of data gaps
3
Identification of potential source materials
Hypothesis building to justify use of source materials
Consider similarities in physicochemical parameters
Consider relationships between physicochemical parameters and toxicokinetics and hazard
Identify information needed to substantiate the hypothesis
4
Substantiate hypothesis
Information gathering
Consider data needed to improve argumentation
Build testing strategy
5
Assess new data
Hypothesis sufficiently substantiated?
6
YES
Fill data gap

Organisation for Economic Co-operation and Development

ENV/JM/MONO(2018)28

Unclassified

English - Or. English

21 September 2018

ENVIRONMENT DIRECTORATE
JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY

Cancels & replaces the same document of 19 September 2018

CASE STUDY ON GROUPING AND READ-ACROSS FOR NANOMATERIALS – GENOTOXICITY OF NANO-TIO2

Series on Testing and Assessment
No. 292

Endpoint considéré = Danger génotoxique tel que déterminé par le test des **comètes in vitro**

Six nanoformes de TiO2 comme substances sources (analogues) pour prédire par lecture croisée le potentiel génotoxique des **2 nano-TiO2 cibles**

≠ par leur taille, leur revêtement, leur cristallinité (anatase et rutile) et leur hydrophobicité (hydrophobes et hydrophiles)

Dans cette étude de cas, les données de comètes pour TiO2 Rutile (R) nano (Sigma 637262) et pour TiO2 Anatase (A) nano (Sigma 637254) sont manquantes ➔ à combler par lecture croisée

1 - identification et caractérisation appropriée des nanoformes de la substance

« What they are? » *(propriétés physico-chimiques des **NM source**)*

Property	NM100	NM101	NM102	NM103	NM104	NM105
Crystal type	Anatase	Anatase	Anatase	Rutile	Rutile	83% anatase 17% rutile
Other info	Dry-milled	Semiconductor catalyst used in photocatalytic process	photocatalytic	hydrophobic	hydrophilic	-
Total non-TiO_2 content including coating and impurities (% w/w)	1.5	9	5	11	11	0.11
Surface chemistry (as declared by manufacturer)	uncoated	uncoated	uncoated	Al_2O_3 and SiO_2	Al_2O_3 and SiO_2	uncoated
Surface coating (% w/w)	0	0	0	8	8	0
Organic matter (%)	0	8	0	2	2	0
Primary particle diameter (TEM) (nm)	93 ± 23	5 ± 1	22 ± 10	24 ± 2	24 ± 2	20 ± 3
Crystallite size (XRD) (nm) [a]	117 ± 40	7 ± 2	24 ± 5	24 ± 4	25 ± 4	22 ± 5
Particle Size Distribution average (nm) [b]	210 ± 10	278	440 ± 37	135 ± 25	145 ± 35	177 ± 39
Shape	Spheroidal	Spheroidal	Spheroidal	Spheroidal	Spheroidal	Spheroidal
Aspect ratio	1.53	1.53	1.53	1.7	1.53	1.36
Specific surface area (m^2/g)	9	242 ± 73	77 ± 10	54 ± 4	54 ± 2	47 ± 0.5

Endpoint considéré = Danger génotoxique tel que déterminé par le test des **comètes in vitro**

Pour la réactivité ("*ce qu'ils font*"), informations toxicologiques recueillies :

- Public OECD dossiers (OECD 2015)
- REACH registration dossiers as of March 2016
- Report on nano-TiO2 proposal for classification from ANSES (2016),
- JRC Repository (Rasmussen et al. 2014)
- Nanogenotox FP7 project (Nanogenotox 2012).

Résultats des tests comètes in vitro pour tous les analogues identifiés

Résultats **positifs et négatifs** (tests positifs sur l'ensemble des tests disponibles)

« What they do? » *(Résultats génotoxicité des NM source)*

	Name	NM-100	NM-101	NM-102	NM-103	NM-104	NM-105
In vitro	Micronucleus assay	-	-	3/10	3/8	3/8	4/18
	Comet	2/2	2/6	5/8	0/6	0/6	10/14
	Chromosomal aberration	-	-	-	-	-	0/1
In vivo	Micronucleus assay	-	0/3	0/6	0/5	0/5	2/9
	Comet	-	1/5	2/13	1/12	2/12	4/15
	Chromosomal aberration	-	-	0/2	-	-	-

Selon la tendance identifiée pour les résultats comète in vitro, 2 groupes d'analogues identifiés selon leurs caractéristiques P-C

	Naked particle	Particle with high non-TiO_2 content (coating and impurities)
NMs	NM-100, NM-102, NM-105	NM-103, NM-101, NM-104
DNA damage	+	-

➔ **Résultats positifs pour NM-100, NM-102 et NM-105**

Etablissement de la matrice pour reporter les données recueillies

		Source analogues						Target NMs	
	Name	NM-100	NM-101	NM-102	NM-103	NM-104	NM-105	TiO_2 R	TiO_2 A
TOXICOLOGICAL INFORMATION	*In vitro* comet assay	+	-	+	-	-	+	?	?
	Particle size distribution in MQ, 1min (nm)	201.3	500.9	505.7	1977.0	194.3	227.5		
	Zeta Potential in MQ, 1min (mV)	-24.5	-27.2	-27.1	39.1	-23.4	-23.8		
	Zeta Potential DMEM 10 FBS, M1, 1 min (mV)	78.40	0.13	-10.50	-12.40	-9.38	-9.92		
	Zeta Potential PBS, 20 min (mV)	-20.2	-21.7	-18.5	-20.9	-20.3	-33.2		
	Zeta Potential DMEM 5 FBS, 20 min (mV)	-10.4	-11.3	-9.5	-13.7	-9.4	-11.9		
	PdI in PBS, untreated	0.219	0.239	0.769	0.255	0.232	0.232		
	PdI in MQ, 1 min	0.205	0.274	0.248	0.393	0.236	0.211		
	PdI in DMEM & L-glutamine, 20 min	0.515	0.247	0.227	0.264	0.209	0.341		
	PdI	0.303	0.323	0.427	0.292	0.227	0.245		
Where they go	Isoelectric Point (Mean) (pH)	NA	5.5	6.0	8.3	8.5	6.8		
	Isoelectric Point (Min) (pH)	NA	5.3	6.0	8.2	8.2	6.6		
	Isoelectric Point (Max) (pH)	NA	5.7	6	8.5	8.8	6.9		
	Density (g/mL)	3.84	3.99	3.84	4.02	4.09	4.05		
	Mean of total pore volume (mL/g)	0.032	0.319	0.300	0.262	0.194	0.194		
	Micropore surface area (m^2/g)	0	13.625	1.108	0	0	0		
	Micropore volume (mL/g)	0	0.00179	0.00034	0	0	0		
	Dustiness-Respirable(mg/kg)	1500	5600	9200	19000	6400	11000		
	Biodurability 24h 0.05% BSA (Ti content) (µg/l)	5.2	0	0	0	0	0		
	Biodurability 24h Gambles solution (Ti content) (µg/l)	0	0	3388	0	0	0		
	Biodurability 24h Caco2 (Ti content) (µg/l)	796	3414	1741	222	3386	2724		
What they do	Redox caco2 medium [a]	1	-1	-1	1	-1	-1		
	Redox Gamble's solution [a]	1	0	-1	1	-1	-1		
	Redox BSA [a]	0	0	0	0	0	0		

L'ensemble des données sur les analogues montre que

Les NM enrobées s'avèrent négatives dans le test des comètes, tandis que celles qui ne sont pas enrobées et qui contiennent des impuretés organiques sont positives.

Name	NM-100	NM-101	NM-102	NM-103	NM-104	NM-105	TiO_2 R	TiO_2 A
In vitro comet assay	+	-	+	-	-	+	-	+

Dans la génotoxicité primaire directe et indirecte, l'interaction physique d'un NM avec l'ADN (directe) ou un autre composant cellulaire (ex. une réaction d'oxydoréduction à médiation enzymatique) qui génère des ROS (indirecte) est nécessaire pour que l'ADN soit endommagé.

Le revêtement NM agit comme une barrière physique qui peut empêcher ce contact entre les atomes de Ti et d'O du TiO2 et l'ADN ou d'autres composants cellulaires.

➔ Le nano-TiO2 revêtu sera probablement NON génotoxique dans le comètes car pas d'interaction physique entre les atomes de Ti / O et les composants ADN / cellules.

Autres exemples d'utilisation du Read-Across & grouping (Nanoreg[1])

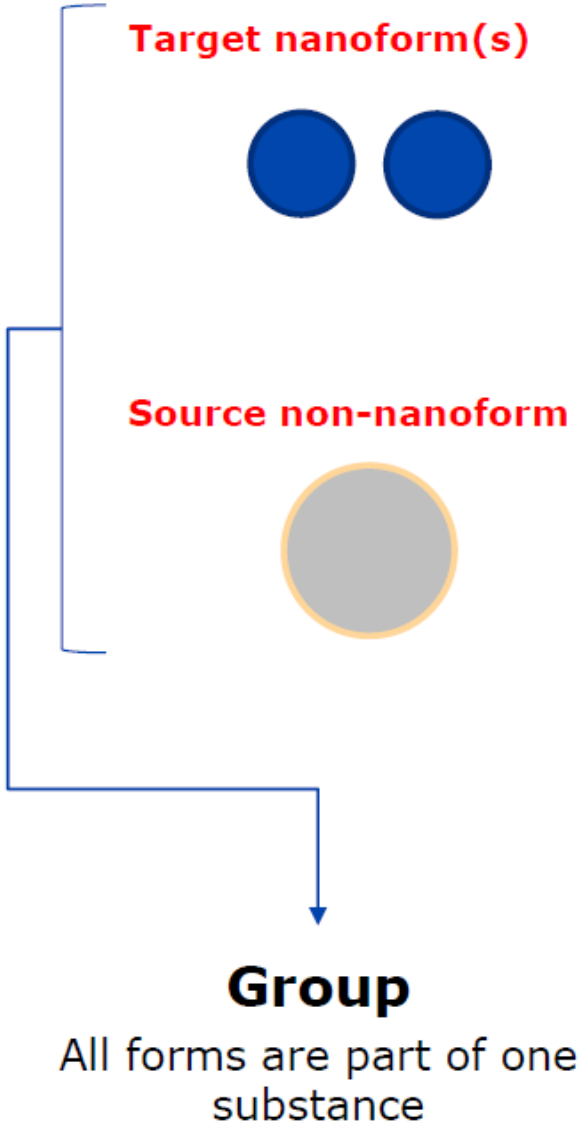
- **HARNs :** Regroupement initial basé sur la **forme** et la **solubilité**
- **Composés de nickel** : Read-across avec non-nanoformes basé sur la **solubilité/libération d'ions métalliques**
- **Fibres céramiques réfractaires :** Read-across avec non-nanoformes basé sur le paradigme des **fibres**
- **NPs de TiO2 :** Read-across et regroupement de nanoformes basés sur l'**identité chimique** et **l'activité photocatalytique**
- **NPs d'argent :** Read-across et regroupement des nanoformes en fonction de la **taille**, de la **forme** et du **traitement de surface**
- **NTC :** Read-across / regroupement basés sur le paradigme des **fibres pathogènes**

Est-il concevable de regrouper les PSLT?

- Existe-t-il une base technique pour évaluer les PSLT en tant que groupe ? Si oui, comment seraient-elles définies ?

- Comment déterminer les **doses maximales tolérées** pour les études par inhalation de particules peu solubles et comment les réponses observées à des niveaux supérieurs doivent-elles être extrapolées?

- La réaction pulmonaire du rat à des doses élevées de particules comme le dioxyde de titane et le noir de carbone est-elle unique à cette espèce, ou **le rat est-il une espèce sensible et pertinente pour l'homme** ?



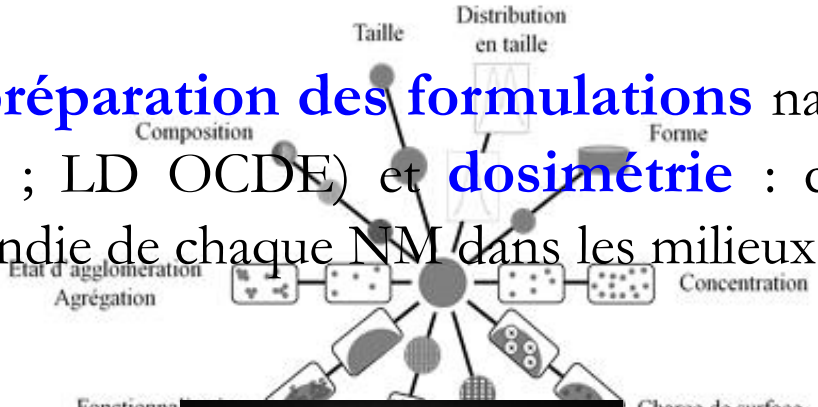
Conclusion générale ERS nano

Prendre en compte la spécificité des nanomatériaux

➔ Modifier et/ou d'adapter les méthodologies de caractérisation des dangers (éco)toxicologiques afin d'améliorer la fiabilité et la prédictivité des essais sur NM.

1. **Caractérisation physicochimique** initiale complète du NM étudié, socle indispensable prélude à toute expérimentation.

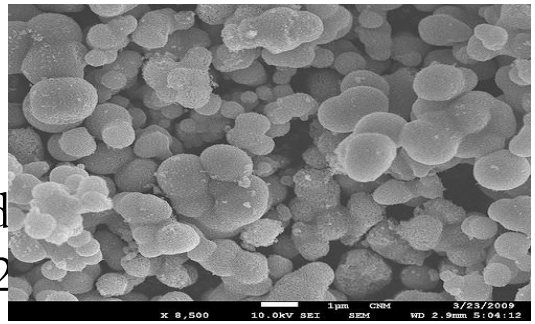
2. Méthode de **préparation des formulations** nanoparticulaires = étape clé (ECHA 2012 ; LD OCDE) et **dosimétrie** : caractérisation physico-chimique approfondie de chaque NM dans les milieux d'essai







TiO2 observé au MEB



ètres phys ier pour d

ropriétés SO/TC 2

Conclusion générale ERS nano

3. Choix du **système d'essai** et des **conditions expérimentales** :

Argumenter le **choix du modèle expérimental** (type cellulaire et mode de culture, espèce animale,...) et les **conditions de traitement** (doses, durée, fréquence, mode d'exposition,...) et

3a. S'affranchir des **phénomènes de biais et d'interférences** avec les paramètres mesurés ➔ **Interprétation !**

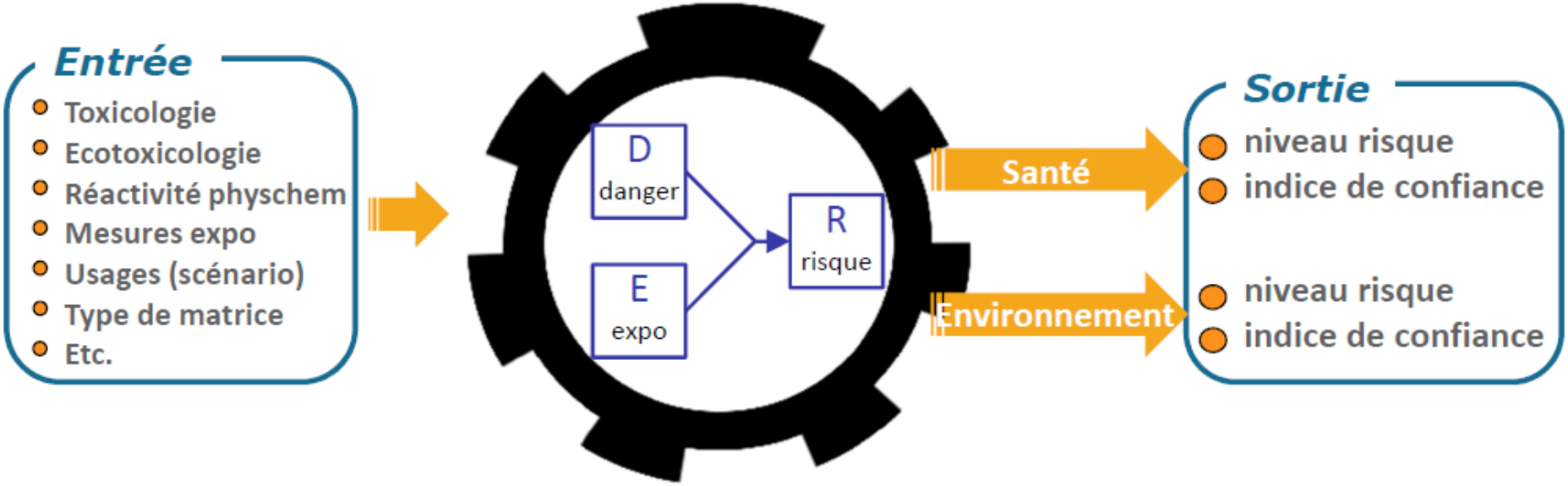
3b. Intégrer aux essais des **matériaux de référence** (nano et non nanométrique) pour garantir la sensibilité et la spécificité du système d'essai mis en œuvre (Dusinska et al, 2013)

3c. Vérifier la **reproductibilité des résultats** obtenus *in vitro*

4. Grande variété de NM et capacité à changer au cours de leur cycle de vie, le **développement de nouveaux outils** et de **nouvelles approches** est indispensable pour une évaluation nano-spécifique des risques.

Conclusion sur l'évaluation des risques "nano-spécifique"

- **ERS ~~au cas-par-cas~~ : Difficile (impossible !) à appliquer pour la prise en charge à court ou moyen terme de la situation actuelle**



✓ **Nouvelles approches tox : Haut-Débit / Réglementaire,** *QSAR*

3. Renforcer la description des expositions

Nécessité de définir quelles situations, quels éléments, peuvent conduire à la plus forte exposition (cycle de vie de chaque application du NM).

Merci pour votre attention

Fabrice.nesslany@pasteur-lille.fr

https://mutagenese.pasteur-lille.fr/accueil/


Institut
Pasteur
de Lille