



Restitution du programme national de recherche environnement santé travail

Exposition aux agents physiques et aux nouvelles technologies : quels effets sanitaires ?

Dossier du participant

12
octobre 2015

Cité internationale universitaire de Paris
Espace Adenauer
17, bd Jourdan - 75014 Paris

Éditorial

Les modes de vie actuels, l'évolution de l'activité professionnelle et le déploiement de diverses innovations suscitent la préoccupation des Français face à diverses nuisances ou à de possibles conséquences sanitaires.

Parmi les nuisances, le bruit figure en bonne place puisque, selon un sondage récent commandité par le Ministère en charge de l'environnement, 86% des Français se disent gênés à leur domicile. Dans le domaine professionnel, plus de trois millions de salariés sont exposés en France, sur leur lieu de travail, de manière prolongée, à des niveaux de bruit potentiellement nocifs. Le bruit est reconnu comme cause de maladies professionnelles depuis 1963.

Un autre sujet de préoccupation concerne l'exposition aux ondes électromagnétiques, qu'elle soit individuelle (tablettes, téléphones mobiles, objets connectés...), collective (antennes-relais, exposition dans les transports en commun...) ou relative à la vie professionnelle. D'après l'édition 2015 du baromètre Anses/ Crédoc sur la perception des risques sanitaires, c'est la deuxième source d'inquiétude après les nanomatériaux.

Placés en tête des préoccupations, les nanomatériaux sont perçus comme étant les produits les moins sûrs par les Français. Depuis une dizaine d'années, les produits contenant des nanomatériaux se sont multipliés mais l'analyse des risques associés n'a pas encore atteint la maturité de celle concernant les substances chimiques.

Les rencontres scientifiques de l'Anses d'octobre 2015 sont donc consacrées à ces trois sources d'exposition caractérisées par une forte préoccupation de la population. Ces sujets font l'objet de recherches actives. La diversité des situations d'exposition de la population générale ou dans le monde du travail, l'évolution des usages de nouvelles technologies, sont associées à de nombreux défis pour les chercheurs : quantification des expositions, évaluation de la gêne liée au bruit, recherche d'effets biologiques des ondes, compréhension du mécanisme d'action des nanoparticules et recherche de méthodes standardisées d'évaluation de risque, etc.

Chaque année, le Programme national de recherche environnement-santé-travail finance entre trente et quarante projets de recherche relatifs à l'évaluation et l'analyse des risques environnementaux pour la santé humaine, que ce soit en population générale ou dans le cadre du travail. Il aborde notamment les questions liées à diverses nuisances et aux nouvelles technologies. Au terme des travaux, les résultats sont présentés à un public scientifique large et diversifié lors des rencontres scientifiques.

Cette journée est donc l'occasion de mieux comprendre les éventuels effets biologiques et mécanismes d'action des agents physiques et de ces nouvelles technologies. La matinée est consacrée d'une part aux ondes électromagnétiques et d'autre part aux nuisances sonores. L'après-midi dédiée aux nanomatériaux permet de mieux comprendre les dynamiques de biodistribution chez l'homme et les mécanismes toxicologiques induits par les nanoparticules.

Nous aurons également l'occasion d'écouter une conférence du Professeur Jean-François VIEL sur la manière dont on peut appréhender les expositions et les effets sanitaires engendrés par l'usage grandissant de ces nouvelles technologies.

Nous souhaitons que cette journée soit riche en dialogues pour que les connaissances scientifiques acquises favorisent une meilleure compréhension et maîtrise des risques sanitaires.

Marc MORTUREUX
Directeur général de l'Anses

Session 1 - Exposition humaine aux ondes

Expression génétique en réponse à une exposition aiguë aux ondes millimétriques

Yann LE PAGE¹ ; Maxim ZADOBOV² ; Denis HABAUZIT¹ ; Yonis SOUBERE MAHAMOUD¹ ; Artem BORISKIN² ; Rémy Le GUÉVEL³ ; Ronan SAULEAU² ; Yves LE DRÉAN¹

¹Institut de recherche sur la santé, l'environnement et le travail (IRSET), Inserm U1085, Rennes ; ²Institut d'électronique et de télécommunications de Rennes (IETR), UMR CNRS 6164, Rennes ; ³Plate-forme ImPACcell (Imagerie Pour Analyse du Contenu cellulaire), UMS-3480, Rennes. Contact : yves.le-drean@univ-rennes1.fr

Introduction

Nous assistons actuellement à une évolution rapide des technologies de télécommunication, ce qui va changer la donne en termes d'exposition. La prochaine véritable rupture sera l'introduction de systèmes sans fil dans la bande des 60 GHz. Les caractéristiques spécifiques de ces nouveaux signaux engendreront des types d'exposition encore jamais rencontrés, notamment une forte absorption superficielle par les tissus humains. Les objectifs majeurs de ce projet consistent à déterminer les effets potentiels des ondes millimétriques (OMM) aux alentours de 60 GHz, sur des cultures de cellules humaines *in vitro*.

Matériels et méthodes

Un système d'exposition pour cellules en culture a été optimisé pour atteindre des densités de puissance moyennes en champ proche de l'ordre de 20 mW/cm², ce qui correspond à la norme limite grand public pour les expositions locales à proximité du corps. Nous avons analysé l'impact de l'exposition sur une lignée de kératinocytes humains et nous avons suivi l'expression de gènes biomarqueurs de l'inflammation ou du stress cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé deux méthodes complémentaires 1) Quantification des ARN messagers par RT-PCR en temps réel ; 2) Quantification intracellulaire des protéines par immunocytofluorescence.

Résultats

Au cours de ce projet, le système d'exposition existant a été amélioré et une étude dosimétrique numérique a été réalisée pour optimiser l'uniformité de la densité de puissance et du débit d'absorption spécifique dans la monocouche cellulaire. Pour suivre l'expression des gènes biomarqueurs choisis, nous avons utilisé une méthode originale d'analyse semi-haut débit et multiparamétrique. Nous avons effectué des marquages par immunofluorescence et réalisé en aveugle des analyses automatiques d'images en microscopie. Cette approche a permis de faire des mesures individuelles pour chaque cellule, ce qui a généré un grand nombre de données sur la taille et la forme des cellules ainsi que sur la localisation et l'intensité du marquage (en corrélation avec le niveau d'expression de la protéine ciblée). Nous avons ainsi gagné en précision et obtenu des données sur l'homogénéité des éventuelles réponses cellulaires. Aucune sous-population de cellules plus particulièrement sensibles aux OMM n'a pu être mise en évidence suite à ces analyses. Au final, nos travaux ne montrent aucune modification de l'expression génétique tant que l'on reste à des niveaux de puissance ne générant pas d'effet thermique. Nous avons pu faire ressortir des différences d'expression mais seulement pour des expositions induisant un choc thermique. En ce qui concerne les biomarqueurs de l'inflammation, nous avons également recherché l'effet des OMM en combinaison avec d'autres stimuli, mimant l'infection et déclenchant une réponse immunitaire. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence l'apparition d'effets biologiques en relation avec l'augmentation de la puissance incidente. Ces expériences nous ont permis de définir des seuils qui, là aussi, correspondent au seuil des effets thermiques.

Conclusion

La conclusion majeure de ce projet est que pour des expositions aiguës, l'expression génétique n'est pas affectée par des expositions à 60 GHz de faibles puissances qui ne génèrent pas d'effet thermique. On peut en déduire que ce type d'exposition ne constitue pas en soi un stress suffisamment fort pour nécessiter une réponse transcriptionnelle de la part des cellules. De plus, nos travaux nous ont permis de mettre en évidence le fait que les kératinocytes sont des cellules particulièrement résistantes aux modifications environnementales. Etant donné que ces cellules sont les principales cibles des OMM, nos résultats sont très rassurants quant à l'utilisation future de ces ondes en télécommunication, du moins en ce qui concerne les effets à courts termes.

Apports à l'évaluation ou à la gestion des risques sanitaires

Nous avons montré que l'effet thermique est la principale cause de la réponse cellulaire après exposition. Ce résultat est important car les normes actuelles d'exposition sont essentiellement basées sur les effets thermiques. On peut donc estimer que les recommandations actuelles, pour les expositions en champs lointains, sont sans doute bien établies. Par contre, la détermination de seuils déclencheurs aux alentours de 10-20 mW/cm² suggère qu'il est nécessaire d'affiner les normes en champ proche. Cependant, il faut noter que notre système d'exposition est un système statique pour cellules en culture. En vue d'obtenir des données qui serviront à redéfinir les normes en champ proche, il serait intéressant de répliquer nos expériences sur des modèles animaux où la thermolyse est possible.

Projet PNR-EST réalisé entre janvier 2011 et décembre 2012.

Définition d'indicateurs pour la caractérisation de l'exposition radioélectrique

François GAUDAIRE¹ ; Julien CAUDEVILLE² ; Philippe DEMARET³ ; Joe WIART⁴ ; Christian PERSON⁵

¹CSTB, Grenoble ; ²Ineris, Verneuil-en-Halatte ; ³INRS, Nancy ; ⁴Orange/WHIST Lab, Issy les Moulineaux ; ⁵Telecom Bretagne, Brest. Contact : francois.gaudaire@cstb.fr

Introduction

Le développement des services de communications sans fil a induit la prolifération des émetteurs radiofréquences dans notre environnement et en milieu professionnel. Ce déploiement suscite inquiétudes et controverses et le débat en France intègre tous les acteurs : ministères, agences de l'Etat, scientifiques académiques, opérateurs, associations, collectivités, entreprises... Les échanges de ces débats font apparaître une grande difficulté à se forger des constats objectifs des situations rencontrées du fait de l'absence d'indicateurs objectifs et robustes de l'exposition. L'objectif du projet DICER était d'étudier les différentes méthodologies permettant de proposer des indicateurs pertinents caractérisant l'exposition des populations aux champs électromagnétiques radiofréquences.

Matériels et méthodes

Après une analyse des indicateurs dans d'autres domaines physiques, une segmentation en configurations et profils a été réalisée pour définir une matrice d'exposition multicritères. Le cas des milieux industriels a été traité spécifiquement avec l'analyse des mesures réalisées sur postes de travail et la construction d'un logigramme d'évaluation de risque. Pour les radiofréquences liées aux communications sans fil, des travaux ont été menés sur la construction et l'analyse d'indicateurs d'exposition. Enfin, un travail a été mené sur la caractérisation du lien entre le débit d'absorption spécifique et le champ électrique.

Résultats

L'analyse comparative multi domaines a montré la nécessité de travailler sur plusieurs indicateurs : courte durée/longue durée, exposition de la population/d'une personne, complémentarité de la modélisation numérique et des mesures.

L'exposition des travailleurs à proximité de machines industrielles a été mesurée sur plus de 400 postes. Un logigramme d'évaluation du risque a été construit pour le soudage par induction, le soudage par pertes diélectriques et le chauffage par micro-ondes. Un Outil Simple d'Évaluation des RAYonnements (OSERA) a été mis au point pour permettre aux entreprises d'estimer sans mesure le risque de dépassement des valeurs réglementaires d'exposition aux champs électromagnétiques.

Un modèle de caractérisation des déterminants d'indicateurs d'exposition aux radiofréquences a été utilisé pour intégrer les variabilités temporelles et spatiales de l'exposition sur différents profils de population. Une grille d'analyse de construction d'indicateurs a été définie. Un outil supplémentaire a été développé pour permettre l'intégration de campagnes de mesures et les résultats de modélisation numérique futurs au sein d'une base de données structurée.

Des analyses statistiques de la variabilité de l'exposition à l'échelle du territoire ont été réalisées, à partir des résultats de mesures et de modélisation numérique disponibles. Les informations obtenues peuvent être utilisées pour optimiser l'échantillonnage spatial et pour définir une valeur de champ électrique représentative d'un lieu, qui pourra être utilisée comme indicateur de l'exposition.

Enfin, un indicateur global d'exposition a été défini, combinant l'exposition des terminaux mobiles et celle des stations de base. Des scénarios typiques ont été définis et analysés avec cet indicateur.

Conclusion

Ce projet a permis de proposer des indicateurs et de définir des outils de caractérisation de l'exposition qui prennent en compte les différentes configurations d'exposition rencontrées, afin de se rapprocher au plus près de la réalité de l'exposition des populations en termes de robustesse et représentativité statistique.

Ces outils pourront être notamment utilisés pour caractériser les inégalités environnementales géographiques associées à l'exposition aux radiofréquences, pour poser des bases techniques consensuelles dans les discussions et débats en cours et faciliter des comparaisons de scénarios.

Apports à l'évaluation ou à la gestion des risques sanitaires

Concernant l'exposition en milieu industriel, la mise au point d'un outil d'évaluation du risque concernant les applications permettra aux entreprises d'évaluer simplement si leurs installations peuvent présenter un risque pour les opérateurs ou le personnel évoluant à proximité.

Dans le domaine des télécommunications sans fil, les procédures d'analyse et exploitation d'outils avec les données de modélisation et de mesures permettent la définition de bases scientifiques consensuelles pour des indicateurs d'exposition pertinents et représentatifs.

Projet PNR-EST réalisé entre décembre 2011 et décembre 2014.

Session 2 - Nuisances sonores des technologies et équipements récents

Développement d'indicateurs épidémiologiques d'exposition au bruit environnemental à un niveau géographique fin. Utilisation pour l'étude du lien entre l'environnement de résidence et le recours aux médicaments psychotropes par une approche multiniveau

Aurélié BOCQUIER^{1,2,3} ; Alexis BIGOT⁴ ; Sébastien CORTAREDONA^{1,2,3} ; Céline BOUTIN⁴ ; Aude DAVID⁴ ; Pierre VERGER^{1,2,3}

¹ORS PACA, Marseille ; ²Inserm, UMR912 (SESSTIM), Marseille ; ³Aix Marseille Université, UMR_S912, IRD, Marseille ; ⁴Soldata Acoustic, Villeurbanne. Contact : aurelie.bocquier@inserm.fr

Introduction

L'exposition au bruit environnemental peut engendrer des problèmes de santé extra-auditifs liés à la santé mentale en particulier. Des cartographies du bruit ont été réalisées en France dans les grandes aires urbaines. A partir de ces données, des recherches étaient nécessaires pour construire des indicateurs épidémiologiques d'exposition au bruit utilisables dans un but de surveillance des effets sanitaires liés au bruit. Ce projet visait à 1) Construire de tels indicateurs à un niveau géographique fin (îlots regroupés pour l'information statistique, Iris) à Marseille ; 2) Vérifier l'existence d'inégalités environnementales d'exposition au bruit ; 3) Étudier les liens entre ces indicateurs et l'usage de médicaments psychotropes.

Matériels et méthodes

Objectif 1 : la méthodologie de cartographie du bruit en milieu urbain a été adaptée pour calculer des indicateurs se rapprochant des expositions réelles. Ils ont été comparés à des mesures de terrain et leur robustesse a été testée. Des indicateurs d'exposition potentielle moyenne au bruit routier pondérés par la population ont été construits à l'échelle des Iris.

Objectif 2 : les liens entre ces indicateurs et un indice de précarité par Iris ont été étudiés en appliquant des méthodologies d'analyse spatiale.

Objectif 3 : les liens entre l'exposition potentielle au bruit routier et l'usage chronique de médicaments anxiolytiques/hypnotiques (mesuré à partir des données de l'Assurance maladie) ont été étudiés par des modèles binomiaux négatifs à inflation de zéros.

Résultats

Les modifications apportées à la méthodologie de cartographie du bruit entraînent une diminution des valeurs de l'indicateur d'exposition au bruit routier, quel que soit l'Iris (-7,4 dB(A) en moyenne pour le Lden (indicateur de la gêne due au bruit) par exemple). Le rang des Iris n'est pas affecté par ces modifications. Sur l'ensemble des 12 points de mesure, les niveaux de bruit issus de la modélisation sont supérieurs aux niveaux mesurés (écarts <5 dB(A) sur 9 points). Des analyses de sensibilité et d'incertitudes suggèrent que les indicateurs développés sont robustes et relativement peu influencés par les variations des paramètres d'entrée les plus influents du modèle de calcul.

Les résultats montrent une relation non linéaire entre l'exposition potentielle au bruit routier et le niveau de précarité de l'Iris : les niveaux d'exposition au bruit les plus élevés sont observés dans les Iris de précarité intermédiaire. Les analyses réalisées à l'échelle des Iris montrent, dans les Iris les plus favorisés uniquement, une probabilité accrue de consommation chronique d'anxiolytiques/hypnotiques (au moins six remboursements sur 2008-2009) lorsque l'exposition potentielle moyenne au bruit routier pondéré par la population (estimation sur 24h) excède 63 dB(A) par rapport à des niveaux inférieurs à 56 dB(A). En raison d'une forte variabilité intra-Iris des niveaux de bruit, les analyses ont été poursuivies en utilisant les estimations d'exposition potentielle au bruit à l'échelle du bâtiment de résidence des individus. Ces analyses montrent que résider dans un bâtiment situé dans les zones les plus favorisées et exposées à des niveaux de bruit routier nocturne ≥ 55 dB(A) (*versus* <45 dB(A)) est associé à un nombre accru de remboursements d'anxiolytiques/hypnotiques (risque relatif ajusté = 1,16 [1,01-1,32]).

Conclusion

La méthodologie développée dans ce projet permet de se rapprocher de niveaux plus réalistes d'exposition au bruit routier même si une surestimation de quelques décibels persiste par rapport aux mesures de terrain.

Les résultats concernant les inégalités environnementales d'exposition au bruit routier diffèrent de ceux le plus couramment observés dans ce domaine. Ils suggèrent que les mécanismes à l'origine de ces inégalités varient selon le contexte économique, social et culturel et incitent à réaliser des études comparatives dans différentes régions, différents pays.

Globalement, cette étude ne montre pas de lien convaincant entre l'exposition potentielle au bruit routier et la consommation de médicaments psychotropes ; les limites et difficultés méthodologiques rencontrées - et inhérentes à toutes les études s'appuyant sur des estimations des niveaux de bruit au bâtiment - ne permettent toutefois pas d'exclure l'existence d'un faible excès de consommation de médicaments psychotropes chez des personnes exposées aux niveaux les plus élevés.

Apports à l'évaluation ou à la gestion des risques sanitaires

Les indicateurs d'exposition potentielle au bruit routier pondérés par la population construits à un niveau géographique fin traduisent en quelque sorte une exposition collective au bruit routier et peuvent s'avérer pertinents dans un objectif de suivi d'une politique locale de santé publique et de lutte contre le bruit. La méthodologie développée dans ce projet est « facilement » reproductible dans d'autres agglomérations disposant d'une cartographie du bruit routier.

Pour étudier l'association entre l'exposition au bruit routier et des répercussions sur la santé mentale ou l'usage de médicaments psychotropes, il paraît indispensable de recourir à un recueil de données individuelles lors d'une enquête *ad hoc* dans des échantillons de population. Ce projet fournit des indications précieuses pour guider les choix méthodologiques d'une telle étude.

Projet PNR-EST réalisé entre 2010 et 2012.

Étude des corrélations et comparaisons entre trois villes européennes : trafic, air, bruit et santé (TRI-TABS)

Rémy SLAMA¹, Xavier MORELLI¹, Alexandre THOMASSON², Xavier BASAGANA³, Inma AGUILERA³, Maria FORASTER⁴, Nino KÜNZLI⁴

¹Inserm et Université Grenoble-Alpes, équipe d'épidémiologie environnementale, Grenoble ; ²Air Rhône-Alpes, Grenoble ; ³CREAL (Research Center in Environmental Epidemiology), Barcelone ; ⁴Swiss Tropical Institute of Public Health (Swiss TPH), Bâle.
Contact : remy.slama@ujf-grenoble.fr

Introduction

La pollution atmosphérique et la pollution sonore sont les plus fréquentes pollutions environnementales en Europe. Le trafic routier est la principale source intra-urbaine de chacune d'elles. Des études récentes suggèrent que l'exposition au bruit lié au trafic pourrait contribuer à l'incidence de l'hypertension artérielle, une pathologie à prévalence élevée augmentant la morbidité cardiovasculaire. Jusqu'aujourd'hui, la majorité des études ont porté sur l'un ou l'autre de ces deux facteurs environnementaux. Or, les résultats obtenus par ces études pourraient présenter un biais de confusion, si l'analyse ne tient pas compte des deux facteurs environnementaux à la fois. Ce projet de recherche a donc été mis en place pour caractériser les relations entre ces deux facteurs environnementaux.

Matériels et méthodes

Un protocole commun de courte durée a été utilisé à Grenoble (France), Bâle (Suisse) et Gérone (Espagne) pour mesurer le bruit, la concentration de particules dans l'air et la densité de la circulation en 40 à 60 emplacements de chaque ville. Les mesures de bruit seront comparées aux valeurs issues des cartes de bruit existantes. De même, les mesures de pollution de l'air seront confrontées aux cartographies de dioxyde d'azote (NO₂), marqueur usuel de la pollution de l'air liée au trafic routier. Dans la ville de Gérone, les estimations des niveaux d'expositions au bruit ont été attribuées à plus de 3 000 participants d'une cohorte existante (REGICOR-Gérone) dont les données sanitaires sont connues et ce afin d'analyser l'association entre le bruit et les niveaux de tension artérielle.

Résultats

Les mesures à court terme de bruit (coefficient de corrélation entre les mesures successives sur un site, $r = 0,86-0,98$ selon la ville) et de comptage de trafic ($r = 0,93-0,95$) étaient stables au cours du temps ; ce n'était pas le cas des comptages de particules ultrafines ($r = 0,12-0,26$).

Les comptages d'UFP (particules ultrafines) et de trafic ont été réalisés à 60 sites de la ville de Bâle et répétés à 3 saisons. Les niveaux médians d'UFP étaient les mieux prédits par un modèle incorporant des variables SIG et des caractéristiques du site ($R^2=0,66$).

Nous avons aussi exploré, pour la première fois en Europe, l'application d'une modélisation de type Land Use Regression (LUR) pour caractériser la variabilité spatiale du bruit lié au trafic à l'échelle intra-urbaine. Les corrélations entre les mesures à court terme de bruit et les modèles réglementaires étaient de 0,62, 0,75 et 0,72 à Bâle, Girone et Grenoble, respectivement. Les modèles LUR expliquaient entre 66% et 88% de la variabilité spatiale des mesures de bruit à court terme.

La dernière sous-étude concernait l'influence du bruit sur la pression artérielle à Girone. La relation entre pollution et pression artérielle variait selon le type d'espace urbain, et était plus faible dans les zones à forte circulation et le centre ville. La corrélation importante entre NO₂ et le bruit, et la dépendance de cette corrélation en fonction de caractéristiques locales complexes, rend nécessaires des études complémentaires.

Les modèles de bruit intérieur ont fourni des résultats plus cohérents du point de vue de l'association avec l'hypertension artérielle que les analyses s'appuyant sur le bruit moyen extérieur seulement.

Conclusion

Les concentrations court terme d'UFP ne pouvaient être prédites de façon satisfaisante par des modèles s'appuyant sur des variables de trafic et d'utilisation du sol et des variables renseignées sur le site de mesure. Cette question nécessite d'être approfondie par des mesures à long terme avec une résolution spatiale fine. Notre projet indique que des stratégies alternatives pour prendre en compte les variations des niveaux d'UFP nécessitent d'être élaborées pour améliorer les modèles de type Land Use Regression.

Concernant le bruit, les modèles LUR s'appuyant sur des données SIG de qualité constituent un outil prometteur pour l'estimation de l'exposition au bruit (extérieur) dans des études épidémiologiques, en particulier dans les zones où des modèles de propagation du bruit ou des cartes développées par les autorités locales ne sont pas disponibles.

Nous avons aussi montré qu'une estimation correcte de l'exposition au bruit à long terme pour des études épidémiologiques nécessite de prendre en compte le bruit intérieur et dans la chambre à coucher.

Apports à l'évaluation ou à la gestion des risques sanitaires

Le projet a fourni des pistes intéressantes pour modéliser le bruit urbain à partir d'un petit nombre de mesures. La modélisation spatiale des particules ultrafines à l'échelle urbaine pose des défis plus importants et nécessite probablement des mesures répétées souvent sur un très grand nombre de sites et/ou des mesures continues en plusieurs sites. En plus des particules en suspension, dont l'impact majeur est reconnu, le bruit constitue probablement un facteur environnemental dont les effets sur la santé sont très conséquents en milieu urbain.

Projet PNR-EST réalisé entre 2010 et décembre 2013.

Projet GABO : Gêne Acoustique en Bureaux Ouverts

Etienne PARIZET¹, Patrick CHEVRET², Marjorie PIERRETTE², Laurent BROCOLINI², Jérémy ROUCH²

*¹Laboratoire vibrations acoustique, INSA-Lyon, Villeurbanne ; ²Institut national de recherche et de sécurité, Nancy
Contacts : etienne.parizet@insa-lyon.fr ; patrick.chevret@inrs.fr*

Le niveau de bruit mesuré dans les bureaux ouverts (parfois appelés bureaux paysagers ou par leur terme anglais open-space) est largement inférieur aux valeurs réglementaires. Pourtant, les occupants de tels espaces se plaignent souvent du bruit, en mettant en avant des conséquences sur leur capacité de travail et sur leur fatigue en fin de journée.

L'objectif général du projet GABO était donc de proposer des indicateurs d'exposition sonore adaptés à ce cas très particulier. La méthode combinait une enquête dans des bureaux, des expériences en laboratoire et le développement d'un indicateur utilisant le bruit enregistré au poste de travail. Ce projet associait le Laboratoire vibrations acoustique de l'INSA-Lyon et le Laboratoire réduction du bruit au travail de l'INRS (Nancy).

Tout d'abord, un questionnaire permettant d'interroger les salariés sur leur environnement de travail a été mis au point.

A partir de quelques entretiens ouverts et d'une revue de la littérature, plusieurs groupes de questions ont été définis. Ces questions se rapportent à la perception par les répondants de certaines sources de bruit typiques de ces locaux (conversations intelligibles, brouhaha de conversations, sonneries de téléphones, imprimantes), en termes d'intensité perçue et de gêne apportée. D'autres questions portent sur la santé ressentie des salariés et leur sensibilité au bruit (qui est classiquement un facteur influent des réponses de gêne).

Ce questionnaire a été proposé aux salariés de différentes entreprises ; pour l'instant, 618 réponses ont été recueillies. Ces réponses montrent que l'environnement est souvent considéré comme bruyant et gênant : l'insatisfaction est donc réelle.

Notons que la proportion de personnes gênées par le bruit augmente avec l'effectif du bureau ouvert. Cependant, les proportions sont identiques pour les catégories «16 à 49 personnes» et «plus de 50 personnes». Il y a donc un effectif minimal des locaux à partir duquel le bruit devient source de gêne.

De plus, les répondants décrivent un effet spécifique des conversations intelligibles : l'évaluation de la gêne due à ces sources est significativement plus élevée que celles des autres sources. Enfin, pour 60% des personnes, les conversations intelligibles perturbent l'activité de travail.

Ce questionnaire est maintenant intégré dans le projet de norme NF S31-199. Ce projet est un complément de la norme S31-080 «Acoustique – Bureaux et espaces associés – Niveaux et critères de performances acoustiques par type d'espace». Il permettra de mesurer objectivement le confort des usagers d'un bureau ouvert et d'aider à définir les solutions d'amélioration, par la connaissance des sources principales de gêne.

Une seconde série d'expériences s'est alors déroulée en laboratoire. L'intérêt du laboratoire est qu'il permet de contrôler parfaitement les conditions expérimentales, au détriment d'une situation parfois différente de la réalité (notamment en termes de durées d'exposition). Nous avons voulu dans un premier temps vérifier s'il est possible de retrouver les résultats de l'enquête *in-situ* dans des expériences de laboratoire. Pour ce faire, des sujets ont dû réaliser des tâches de mémorisation à court-terme (mémoriser des listes de dix mots présentés visuellement pendant deux secondes pour chaque mot), tout en étant exposé à différentes ambiances sonores. Ces ambiances sonores reprenaient les grandes catégories de sources mentionnées dans l'enquête *in-situ* (sauf les bruits de passage qui paraissaient moins gênants), leur niveau sonore étant constant (fixé à 50 dB(A)). Cette expérience a confirmé la plus importante perturbation apportée par une parole intelligible.

La seconde expérience avait pour but d'affiner les connaissances sur cette influence de l'intelligibilité. En effet, un indicateur classique (le Speech Transmission Index) est déjà utilisé pour caractériser l'isolation acoustique entre deux postes de travail (la parole du voisin est d'autant plus perturbante qu'elle est intelligible). Cet indice est d'autant plus élevé que la transmission de la parole est bonne et le niveau du bruit masquant faible. Cependant, l'effet du bruit est considéré par cet indice d'après son spectre moyen. Dans le cas d'un bruit de fond fluctuant (souvent rencontré dans un bureau ouvert), l'intelligibilité peut être améliorée par le phénomène nommé «écoute dans les trous». Une adaptation du STI (le STIt) veut rendre compte de ce phénomène et nous avons souhaité tester cet indice. Pour cela, le protocole précédent a été conservé, mais les conditions sonores comprenaient toujours une voix cible, à laquelle s'ajoutait soit du bruit stationnaire, soit une voix concurrente, soit un mélange de trois ou cinq voix. L'indice STI était identique dans toutes ces situations (0,4) alors que le STIt variait entre 0,3 (pour le bruit stationnaire) et 0,7 (pour un masquage par une voix unique). De même, le niveau global était constant (47 dB(A)). Cinquante-cinq personnes ont participé à cette expérience.

Les résultats étaient contradictoires avec nos attentes : tant du point de vue de la performance (mesure objective) que de la gêne (mesure subjective) : les différentes conditions sont équivalentes. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats :

- l'intelligibilité de la parole n'a pas un effet perturbant dans l'accomplissement d'une tâche de mémorisation court-terme ;
- l'indicateur STIt ne décrit pas cette intelligibilité ;
- les conditions expérimentales ne suffisent pas pour mettre en évidence cet effet.

Nous pensons que les deux premières hypothèses peuvent être rejetées : la littérature est abondante pour décrire la gêne propre à une parole intelligible et l'indice STIt a été validé dans de nombreux cas. Il nous semble en revanche que la durée d'exposition de l'expérience (10 minutes) n'était pas suffisante pour mettre en évidence des effets de second ordre.

La dernière phase du projet concernait donc le développement d'un indicateur. Le STI ne peut pas être utilisé pour caractériser globalement le bruit perçu par un salarié car il suppose d'avoir préalablement identifié une parole cible et un bruit de fond. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches. L'ambition générale est de détecter dans le bruit de fond l'émergence d'une parole intelligible, considérant que celle-ci sera particulièrement gênante. Des techniques d'apprentissage à partir de bibliothèques de signaux ont été utilisées, consistant soit à classer automatiquement les types de bruit de fond, soit à détecter une voix dont on évalue l'intelligibilité.

La première voie a trouvé des limites car les bases de données de signaux utilisés souffraient d'une sous-représentation de certaines sources (notamment en ce qui concerne les sonneries de téléphone et les machines). Pour la seconde approche, il semble que certains indicateurs sont potentiellement utiles. En particulier, la présence de modulation d'amplitude aux fréquences voisines de 4 Hz (qui est importante dans un signal vocal) peut indiquer la présence d'une voix compréhensible. La relation entre cet indice de modulation et l'intelligibilité a été estimée sur un ensemble de signaux pour lesquels les données subjectives d'intelligibilité existent. Les résultats ont montré le lien entre cet indice de modulation et l'intelligibilité de la parole contenue dans le signal, donc, potentiellement, dans la gêne de ce signal. Mais la grande dispersion des résultats montre que d'autres études sont nécessaires pour parvenir à un indicateur validé. Notamment, l'ambiguïté des résultats des mesures en laboratoire de performance et de gêne incite à penser que des expériences utilisant des durées d'exposition plus longues seraient indispensables. Ces expériences devraient également être menées sur un grand nombre de sujets, étant donnée la forte variabilité inter-individuelle notée au cours du projet.

Projet PNR-EST réalisé entre décembre 2011 et décembre 2014.

Session 3 - Exposition et biodistribution des nanoparticules

Développement d'un outil pragmatique d'évaluation des risques liés aux produits de consommation contenant des nanomatériaux

Anthony CADÈNE

Anses, Maisons-Alfort. Contact : antony.cadene@anses.fr

Dans un contexte de fortes incertitudes scientifiques, la gestion des risques liés à l'exposition aux nanomatériaux ne peut aujourd'hui s'appuyer que sur l'interprétation de données parcellaires.

L'Anses s'est autosaisie afin de produire une méthode d'évaluation des risques s'appliquant aux produits de consommation courante contenant des nanomatériaux manufacturés. La méthode proposée s'applique à un produit fini contenant initialement un ou des nanomatériaux manufacturés, pour un scénario donné de l'usage du nano-produit considéré.

Les différents résultats issus du modèle d'évaluation se rapportent :

- d'une part aux risques sanitaires pour les consommateurs et plus largement pour la population générale
- d'autre part aux dangers écotoxicologiques.

La méthode proposée aboutit à l'expression de niveaux de risques sanitaires individuels (interprétés par la combinaison de niveaux d'exposition et de danger) ainsi qu'à une évaluation des niveaux de dangers écotoxicologiques. Les résultats obtenus par cette méthode se rapportent aux effets spécifiquement imputables aux nanomatériaux (et non aux autres substances présentes dans le produit les contenant) dans le cadre de l'usage de nano-produits. La méthode s'intéresse à la mise en œuvre du produit et exclut les phases de production et de traitement du nano-produit en fin de vie (élimination/recyclage).

La démarche proposée est formalisée en trois étapes :

- Analyse et détermination du ou des scénarios d'usage à considérer ;
- Estimation des niveaux d'exposition, de danger et de leurs degrés de pertinence associés ;
- Interprétation et analyse des résultats.

Internalisation et translocation de nanoparticules d'oxyde de silice et d'oxyde de titane dans des cellules épithéliales bronchiques, endothéliales pulmonaires et musculaires

Stéphane MORNET¹ ; Nora REINHARDT¹ ; Olivier LAMBERT² ; Marion DECOSSAS² ; Olivier Le BIHAN² ; Sylvie POUSSARD² ; Grégoire NAUDIN² ; Armelle BAEZA³ ; Sonja BOLOAND³ ; Marie-Caroline BOROT³ ; Sandra VRANIC³ ; Isabelle GEORGE³ ; Isabelle BAUDRIMONT⁴ ; Arnaud COURTOIS⁴ ; Roger MARTHAN⁴

¹Institut de chimie de la matière condensée de Bordeaux, UPR CNRS 9048, Université de Bordeaux, Pessac ; ²Chimie et biochimie des membranes et nano-objets, UMR CNRS 5248, Université de Bordeaux, Pessac ; ³Réponses moléculaires et cellulaires aux xénobiotiques, UMR CNRS 8251, Université Paris-Diderot, Paris ; ⁴Centre de recherche cardio-thoracique de Bordeaux, Inserm U1045, Université de Bordeaux, Bordeaux. Contact : roger.marthan@u-bordeaux.fr

Introduction

La rétention des particules inhalées est un facteur déterminant pour le déclenchement ou l'exacerbation de maladies cardio-pulmonaires. Il apparaît donc important d'étudier si les particules peuvent franchir la barrière alvéolo-capillaire et passer dans la circulation systémique ou modifier la perméabilité de cette barrière physiologique, ce qui favoriserait leur passage.

Les objectifs de ce projet ont été d'évaluer l'internalisation et la translocation, associées à des modifications de perméabilité de la barrière cellulaire de nanoparticules (NPs) de dioxyde de titane (TiO₂) et de dioxyde de silicium (SiO₂) dans les cellules présentes dans l'arbre respiratoire (épithélium respiratoire) et vasculaire pulmonaire et de déterminer le rôle des caractéristiques physico-chimiques (taille, charge de surface).

Matériels et méthodes

Les NPs SiO₂ nues ont été synthétisées par voie sol-gel à l'aide d'un précurseur de silice, les fluorescentes par co-condensation du précurseur avec un silane greffé à la fluorescéine (FITC), les chargées positivement par un agent de couplage silanique aminé (EDPS) et les TiO₂ fluorescentes par encapsulation des NPs SiO₂-FITC par un précurseur de titane.

L'internalisation et la transcytose des NPs ont été évaluées par microscopie de fluorescence et électronique, et quantifiées par cytométrie sur des cellules épithéliales pulmonaires (NCI-H292, Calu-3), musculaires (C2C12) et endothéliales (HPAEC). La translocation a été évaluée par mesure de fluorescence au pôle basal après application des NPs au pôle apical des cellules et l'intégrité de la barrière par la résistance électrique transépithéliale.

Résultats

L'obtention de NPs SiO₂ de tailles différentes (15, 50 et 100 nm) nues ou fluorescentes a été validée par microscopie électronique et mesure de diffusion dynamique de la lumière. La silice est chargée négativement à pH 7,4 et la modification de charge par l'EDPS a été confirmée par mesure d'un potentiel zêta positif. Ces particules présentent une floculation rapide dans les milieux de culture en présence de sérum. Lors de l'encapsulation des NPs SiO₂-FITC pour former les NPs TiO₂ fluorescentes (70 et 140 nm), les propriétés de la FITC sont peu modifiées avec un léger décalage d'émission vers le rouge.

L'internalisation des NPs est observée dans tous les types cellulaires et dépend de la dose et du temps d'exposition.

L'internalisation des NPs SiO₂ de 50 nm par les cellules NCI-H292 dépend de l'énergie et fait intervenir la macropinocytose. Il en est de même dans les cellules HPAEC où en plus de la macropinocytose, interviennent les voies de la clathrine et de la cavéoline pour les NPs 50 nm et 15 nm respectivement. La charge positive des NPs augmente l'internalisation alors que le sérum ou le surfactant pulmonaire la diminue.

La translocation dans les cellules Calu-3 augmente avec le temps d'exposition (de 4 à 15h) puis se stabilise à 24h. La translocation augmente avec la diminution de la taille et diminue avec la charge positive. Les NPs TiO₂ présentent un niveau de translocation intermédiaire entre les 2 types de NPs SiO₂. La translocation est modulée en contexte inflammatoire ou si on ajoute du sérum ou du surfactant. Dans les cellules HPAEC, cette translocation semble moins évidente et reste à confirmer. En marge du projet, nous avons montré dans les cellules musculaires C2C12 que ces mêmes NPs restent présentes pendant au moins 10 j sans évidence d'externalisation.

Conclusion

Les résultats de ce projet ont permis l'apport de nouvelles données sur la synthèse des NPs et leur internalisation, leur transcytose et les mécanismes impliqués. Nous avons pu obtenir des NPs de tailles et de caractéristiques physico-chimiques différentes et mettre au point une stratégie originale de synthèse des NPs TiO₂ fluorescentes. Nous avons pu mettre en évidence, quantifier et caractériser l'internalisation et la translocation de ces NPs dans les cellules musculaires, épithéliales et endothéliales pulmonaires. L'internalisation et la translocation dépendent à la fois des caractéristiques physico-chimiques des NPs mais aussi de leur environnement, sans pour autant exercer d'effet délétère sur la barrière ce qui laisse suggérer essentiellement une transcytose.

Apports à l'évaluation ou à la gestion des risques sanitaires

Cette étude a permis de démontrer l'internalisation et la translocation de NPs au travers de barrières épithéliales ainsi que la possibilité et l'intérêt d'utiliser des approches *in vitro* pour quantifier et caractériser ces phénomènes. La biopersistance et les cinétiques d'élimination à plus long terme restent à établir. L'ensemble de ces données sur les capacités d'entrée/passage des NPs selon leurs propriétés physico-chimiques pourraient alimenter des modèles nanoQSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) et PBPK (Physiology Based Pharmacokinetic) pour une meilleure caractérisation du danger des NPs que ce soit dans un contexte d'exposition professionnelle, environnementale ou dans le contexte de la nanomédecine.

Projet PNR-EST réalisé entre décembre 2010 et février 2014.

Biométrie des particules ultrafines : application dans le cadre de deux études

Mickaël RINALDO^{1,3}, Pascal DUMORTIER⁴, Laurent MARTINON⁵, Jean-Claude PAIRON^{6,8}, Patrick BROCHARD^{2,3,10}

¹Institut universitaire Romand en santé au travail, Epalinges-Lausanne, Suisse ; ²Université de Bordeaux, Bordeaux, France ; ³Inserm, U897, Bordeaux, France ; ⁴Hôpital Erasme, Université libre de Bruxelles, Belgique ; ⁵Laboratoire d'étude des particules inhalées de la Ville de Paris, France ; ⁶Inserm, U955, Créteil, France ; ⁷Université Paris-Est, Créteil, France ; ⁸Centre hospitalier intercommunal Créteil, Service de pneumologie et pathologie professionnelle, Créteil, France ; ⁹Laboratoire d'étude des particules inhalées de la Ville de Paris, Paris, France ; ¹⁰CHU de Bordeaux, France. Contact : mickael.rinaldo@chuv.ch

Introduction

Les études expérimentales et épidémiologiques ont démontré qu'une exposition respiratoire à des particules de taille nanométrique pouvait avoir des effets locaux (pulmonaires) mais également systémiques par exemple sur l'appareil cardio-circulatoire, le système nerveux central ou le système immunitaire.

Ces effets pourraient en partie être liés à leurs propriétés de translocation à travers les barrières biologiques. Compte tenu de l'absence de méthode de référence validée pour la préparation et l'analyse des tissus, il existe très peu de données humaines sur la rétention tissulaire des particules. L'étude Nanotrans visait à proposer une méthode d'analyse et à l'appliquer dans le cadre de deux études sur la rétention pleurale et sur la translocation placentaire.

Matériels et méthodes

Une méthode de préparation (digestion alcaline humide/microfiltration) et d'analyse en microscopie électronique à transmission analytique (quantification par analyse d'image de micrographie et analyse de la composition chimique par spectrométrie à dispersion d'énergie des rayons X) a été mise en place.

Cette méthode a été appliquée dans une étude sur la translocation placentaire (analyse de 30 échantillons pulmonaires fœtaux et comparaison aux données d'exposition maternelles dans le cadre d'une étude observationnelle au CHU de Bordeaux) et une étude sur la translocation pleurale (comparaison des rétentions pleurales et parenchymateuses pulmonaires chez 10 patients issus d'une étude autopsique réalisée à l'hôpital Erasme, Bruxelles).

Résultats

Dans l'étude sur la translocation placentaire, des particules ont été retrouvées dans 77% des échantillons pulmonaires fœtaux avec des concentrations allant de 2,8 à 43,8 x 10⁶p/g de poids sec. 73,4% des particules étaient des agrégats composés de particules individuelles de taille d'environ 50 nm pour les particules de carbone et de 10 à 300 nm pour les particules métalliques. 72,6% des particules retrouvées étaient métalliques, principalement des particules de fer (34,3%), de titane (10,8%), d'alliages inoxydables type fer-chrome-nickel (9,6%) et d'aluminium (7,7%). Des particules de carbones ont été retrouvées dans 5 échantillons et représentaient 12,2% du total. La moyenne des concentrations numériques en particules de carbone était significativement supérieure dans le groupe des mères exposées à la fumée de tabac.

Dans l'étude sur la translocation pleurale, les concentrations moyennes en particules étaient du même ordre dans les « black spots » (plèvre anthracosique) (16.2±26 x10⁹ particules/g) que dans le parenchyme (9.2±7.8x10⁹ p/g), significativement supérieures à celle de la plèvre saine (1.1± 0.6x10⁹ p/g). Plus de la moitié des particules étaient des agrégats de particules ultrafines (black spots : 65.3%, plèvre : 54.1%) principalement de carbone. Les particules étaient plus petites dans la plèvre saine (diamètre moyen : parenchyme 623 ±129.1 nm, black spot : 533±103 nm, plèvre saine : 296±153 nm). Les compositions chimiques étaient globalement similaires dans le poumon et les « black spots ».

Des particules exogènes de fer, d'acier inoxydable, de titane ont, par exemple, été retrouvées dans les deux types d'échantillons.

Conclusion

L'étude Nanotrans a permis de mettre au point une méthode de préparation et d'analyse d'échantillons et de fluides biologiques permettant de caractériser et quantifier les particules fines et ultrafines. L'application de cette méthode dans deux études a permis de démontrer chez l'homme que des particules de taille nanométrique après inhalation et translocation régionale ou systémique pouvaient se retrouver dans des tissus fœtaux ou pleuraux.

Apports à l'évaluation ou à la gestion des risques sanitaires

L'étude Nanotrans a permis de mettre au point et de valider une méthode de préparation des tissus et d'analyse des particules fines et ultrafines utilisable à des fins de recherche ou dans la surveillance biologique de populations exposées (expositions professionnelles ou environnementales). Elle a également permis de disposer de premières données sur la rétention parenchymateuse et pleurale indispensables pour l'établissement de valeurs de référence.

Projet PNR-EST réalisé entre mars 2010 et juillet 2014.

Étude du passage de la barrière air-sang de nanotubes de carbone après une exposition pulmonaire

Bertrand CZARNY¹ ; Dominique GEORGIN² ; Fannely BERTHON¹ ; Gaël PLASTOW¹ ; Mathieu PINAULT³ ; Gilles PATRIARCHE⁴ ; Aurélie THULEAU¹ ; Martine MAYNE L'HERMITE³ ; Frédéric TARAN² ; Vincent DIVE²

¹CEA-Saclay, Service d'ingénierie moléculaire des protéines, Labex LERMIT, CEA-DSV-iBiTecS, Gif-sur-Yvette ; ²Service de chimie bioorganique et de marquage, CEA-Saclay, CEA-DSV-iBiTecS, Gif-sur-Yvette ; ³Laboratoire Francis Perrin (CNRS URA 2453), CEA-Saclay, CEA/IRAMIS/NIMBE, Gif-sur-Yvette ; ⁴Laboratoire de photonique et de nanostructures, CNRS-LPN, Marcoussis.
Contact : frederic.taran@cea.fr

Introduction

Les nanotubes de carbone (NTCs) représentent une classe très particulière de nanoparticules dont les propriétés mécaniques et électroniques exceptionnelles ont motivé des applications dans divers secteurs de la société, depuis les matériaux de structure jusqu'à certains composants électroniques.

Les nombreuses utilisations présentes et futures des nanotubes de carbone justifient les études menées dans le monde entier sur leur impact sur la santé humaine et sur l'environnement.

Matériels et méthodes

Les quatre laboratoires impliqués dans ce projet se sont associés pour étudier la distribution de ces nanoparticules au cours du temps chez la souris suite à une contamination par voie pulmonaire.

Nous avons utilisé un marquage radioactif combiné à des outils de radioimagerie, afin d'atteindre une sensibilité de détection la plus grande possible. Ainsi, des atomes de carbone stables (^{12}C) ont été remplacés, directement pendant la fabrication des nanotubes, par des atomes de carbone radioactifs (^{14}C) au sein même de la structure des nanotubes de carbone. Cette méthode permet d'utiliser des nanotubes de carbone comparables à ceux produits industriellement, mais marqués au ^{14}C . Par radioimagerie, l'approche permet de détecter jusqu'à une vingtaine de nanotubes de carbone sur une coupe de tissus de l'animal. Les méthodes de synthèse de nanotubes développées dans ce projet nous ont permis de préparer 3 lots de nanotubes fortement marqués au ^{14}C qui diffèrent par leur paramètre de taille, longueur et diamètre.

Résultats

Ce projet a permis tout d'abord la mise au point des synthèses de nanotubes de carbone radiomarqués au carbone 14 de diamètres et de longueurs variables. Le taux d'incorporation de carbone 14 , presque 1 000 fois supérieur à ceux précédemment décrits, a permis un niveau de détection de ces nanoparticules *in vivo* inédit. En utilisant ces nanotubes radiomarqués et des radioimageurs très sensibles nous avons pu démontrer que seulement une vingtaine de nanotubes pouvait être détectée chez la souris ce qui constitue une première. De plus, contrairement aux études décrites dans la littérature, les nanotubes produits dans le cadre du projet Bio ^{14}CNT ont été radiomarqués par un élément constitutif de ces nanoparticules (le carbone) donc sans modification de structure, de ce point de vue ils représentent donc des objets uniques.

Après une exposition pulmonaire de souris (20 microgrammes de nanotubes marqués, administrés en une seule fois au début du protocole) et un suivi pendant 2 ans, cette étude a permis d'obtenir des données de biodistribution quantitative de 3 lots de nanotubes de longueur et diamètre différents. Elle a montré que ces paramètres de taille avaient une influence importante sur la biodistribution. De plus, cette étude a démontré le passage des nanotubes de carbone du poumon vers différents organes, notamment le foie, la rate et la moelle osseuse. Elle démontre la capacité de ces nanoparticules à franchir la barrière pulmonaire (barrière air/sang). Par ailleurs, il a été observé une augmentation continue au cours du temps de la quantité des nanotubes de carbone dans ces organes, traduisant une absence d'élimination de ces particules, sur cet intervalle de temps.

Conclusion

La première conclusion de cette étude est qu'une partie importante des nanotubes déposée dans les poumons est éliminée dès le premier jour mais qu'une autre partie, dont la proportion dépend des paramètres de taille des NTCs, persiste dans les poumons sur de très longues périodes. Une autre observation jamais reportée jusqu'alors concerne l'existence d'une translocation des nanotubes des poumons vers des organes secondaires, donc la capacité des nanotubes à franchir la barrière air/sang. Avec des pourcentages inférieurs à 1% de la dose administrée, le taux de translocation est extrêmement faible, mais représente quand même des millions de nanotubes persistant dans différents organes cibles. Cette étude pose les bases de futurs travaux qui viseraient à établir si la présence de ces nanotubes entraîne sur le long terme une altération de la fonction des organes cibles comme la rate ou la moelle osseuse.

Apports à l'évaluation ou à la gestion des risques sanitaires

Sur la base de nos observations, une toxicité aiguë semble exclue. Cette étude démontre aussi que la longueur des nanotubes joue un rôle dans l'élimination et la translocation des nanotubes. Des nanotubes de petite taille semblent présenter une meilleure clairance pulmonaire et un faible taux de translocation. Cependant, pour les trois lots de nanotubes traités dans ce projet, une rétention pulmonaire correspondant à environ 10% de la dose initiale a été observée sur toute la durée de vie des animaux. L'ensemble de ces résultats semblent montrer qu'il n'existe pas de système naturel efficace d'élimination de ces nanoparticules.

Projet PNR-EST réalisé entre du 12-2011 au 02-2015.

Session 4 - Toxicité des nanoparticules

Nouvelles données concernant la toxicité et les effets fonctionnels des nanoparticules d'argent et d'oxyde de zinc vis à vis des macrophages et des cellules dendritiques

Catherine AUDE-GARCIA¹ ; Marie CARRIERE² ; Saadia Kerdine-Römer³ ; Marc Pallardy³ ; Thierry Rabilloud⁴

¹CEA-Grenoble, iRTSV/LCBM, Grenoble ; ²CEA-Grenoble, INAC/LAN, Grenoble ; ³Inserm UMR996, Chatenay-Malabry, France
⁴CNRS UMR5249 (CNRS-CEA-UGA), Grenoble. Contact : thierry.rabilloud@cea.fr

Introduction

Dans un contexte de réduction drastique de l'expérimentation animale, la détermination des effets complexes des nanoparticules représente un véritable enjeu. En particulier, les effets des nanoparticules sur le système immunitaire inné peuvent représenter un risque à long terme, que ce soit *via* une répression de l'immunité ou au contraire une hyper-inflammation. Pour aborder ces effets, nous avons étudié les effets de deux nanoparticules (argent et oxyde de zinc) sur les macrophages et les cellules dendritiques, deux types cellulaires pilotant la présentation antigénique et l'inflammation et ce en utilisant différents schémas d'exposition aux nanoparticules.

Matériels et méthodes

Pour étudier les effets des nanoparticules d'argent et d'oxyde de zinc, nous avons utilisé des macrophages et des cellules dendritiques primaires de souris issus de moelle osseuse. Nous avons suivi l'internalisation par microscopie électronique, quantifié les métaux internalisés par la méthode PIXE et mesuré les effets fonctionnels en termes de production de cytokines, d'expression des marqueurs de surface et de phagocytose. Pour les nanoparticules d'argent, nous avons utilisé plusieurs schémas d'exposition : dose unique pendant 24 heures, suivies ou non d'une période de récupération de 72 heures, ou encore dose fractionnée en 4x24 heures.

Pour les nanoparticules d'oxyde de zinc, nous avons complété ces travaux par une approche protéomique réalisée sur des lignées macrophagiques.

Résultats

Oxyde de zinc

Les nanoparticules d'oxyde de zinc s'avèrent toxiques pour les macrophages et les cellules dendritiques, à des doses de l'ordre de la dizaine de ppm. Cependant, ces nanoparticules ont un faible effet intrinsèque à des doses non toxiques : elles n'entraînent pas de production de cytokines pro-inflammatoires et ne perturbent pas l'expression des marqueurs de surface ou la phagocytose. En revanche, elles perturbent la réponse cellulaire induite par des produits bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS), en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 et en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL10. Enfin, ces nanoparticules ont un effet génotoxique et l'analyse protéomique a permis de suggérer un mécanisme passant par la production de méthylglyoxal.

Argent

Les nanoparticules d'argent de 100 nm utilisées s'avèrent toxiques pour les macrophages à des doses de l'ordre de la dizaine de ppm en cas d'exposition aiguë. En revanche, l'exposition fractionnée à la même dose totale d'argent induit une mortalité cellulaire bien plus faible, alors même que la quantité d'argent internalisée est légèrement supérieure. De plus, nous avons observé que les macrophages relarguent la moitié de l'argent internalisé en 72 heures de récupération sans nanoparticules.

A des doses sub-toxiques, les nanoparticules d'argent ont des effets fonctionnels forts : dépression de l'activité phagocytaire et de la production de NO en réponse au LPS, légère augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS. En revanche, ces effets ne sont observés qu'au sortir d'une exposition aiguë. Ils sont fortement atténués soit après une période de récupération de 72 heures, soit dans le cas d'une exposition fractionnée.

Conclusion

Ces résultats montrent une absence d'effets directs des nanoparticules d'oxyde de zinc sur les macrophages et les cellules dendritiques à des doses sub-toxiques. Cependant, les nanoparticules d'oxyde de zinc produisent des effets métaboliques sur les cellules. Elles perturbent aussi le profil d'expression des cytokines en réponse à un stimulus de type bactérien, suggérant des effets immuno-modulateurs.

En ce qui concerne les nanoparticules d'argent, un effet direct de ces nanoparticules sur les cellules immunitaires est observé, même à des doses sub-toxiques. Cependant, cet effet est en grande partie réversible si l'exposition aux nanoparticules s'arrête, et à dose égale, il est aussi nettement moins important dans le cas d'une exposition répétée par rapport à une exposition aiguë.

Apports à l'évaluation ou à la gestion des risques sanitaires

Alors que l'appréhension du danger représenté par les nanoparticules est encore dominée par le danger inflammatoire de type silicose, nos travaux montrant une diminution ou une réorientation de l'activité des macrophages sous l'influence des nanoparticules, ouvrent la possibilité d'un autre type de danger d'origine immunitaire, se traduisant par une sensibilité accrue aux infections ou au cancer.

En particulier, les mécanismes suggérant des effets génotoxiques du zinc méritent d'être étudiés dans d'autres types cellulaires plus vulnérables que les macrophages et les cellules dendritiques.

Enfin, nos travaux sur les nanoparticules d'argent montrent tout l'intérêt d'étudier des scénarios d'exposition variés représentant des risques différents (exposition chronique vs. accidentelle)

Projet PNR-EST réalisé entre janvier 2012 et décembre 2014.

Nanotubes d'imogolite : un nouveau matériau modèle en nanotoxicologie ?

Jérôme ROSE¹, Wei LIU², Sybille van den BRULE², Perrine CHAURAND¹, Clément LEVARD¹, Carole DI GIORGIO³, Michel DE MEO³, Yousof YAKOUB², Astrid AVELLAN⁴, Armand MASON⁴, Mélanie AUFFAN⁴, Antoine THILL⁴, Daniel BORSCHNECK⁴, Emmanuel DOELSCH⁵, Dominique LISON⁶

¹Centre de recherche et d'enseignement de géosciences de l'environnement (CEREGE), UM 34 CNRS / Université Aix-Marseille / IRD Aix-en-Provence, France ; ²Louvain Centre for Toxicology and applied Pharmacology (LTAP), Université catholique de Louvain, Louvain, Belgique ; ³Institut méditerranéen de la biodiversité et d'écologie marine et continentale (IMBE), UMR Université Aix Marseille/CNRS 7263/IRD 237/Université Avignon, Marseille, France ; ⁴Laboratoire interdisciplinaire sur l'Organisation nanométrique et supramoléculaire, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France ; ⁵UR recyclage et risque Cirad, Montpellier, France. Contact : rose@cerege.fr

Introduction

Popularisés dans les années 90, les nanotubes de carbone (NTC) ont suscité un enthousiasme énorme en raison de leurs propriétés exceptionnelles. Néanmoins, leur forme très similaire à celle de l'amiante a soulevé des inquiétudes et des débats généralisables à l'ensemble des nanofibres.

La forte variabilité de composition et de forme des NTC représente une difficulté majeure pour déterminer sans ambiguïté les paramètres à l'origine d'effets toxiques (longueur, diamètre, structure de la paroi, impuretés...).

Le projet nanotoxIMO s'est inscrit dans ce contexte en utilisant des nanotubes d'imogolite comme modèle expérimental de nanotubes avec l'objectif de contribuer à la caractérisation de la toxicité des nanotubes et d'étudier les paramètres qui gouvernent leur toxicité.

Matériels et méthodes

Trois tâches ont été initiées pour un projet exploratoire de deux ans dont le risque principal résidait dans la synthèse de nanotubes microniques en quantité suffisante. La première tâche visait à tester de nombreuses stratégies de synthèse permettant d'obtenir des nanotubes de longueur variable allant jusqu'au micron. La deuxième tâche se focalisait sur la toxicité *in vitro* à partir de deux modèles cellulaires (cellules J774 (lignée de macrophages murins) et fibroblastes (de primocultures)). La dernière tâche avait comme objectif de déterminer la toxicité *in vivo* chez le rat après instillation intra-trachéale directe après dégagement chirurgical de la trachée.

Résultats

Plusieurs enjeux existaient dans ce projet à caractère exploratoire. Le tout premier consistait, à minima, à définir le caractère toxique et génotoxique des imogolites.

Les travaux engagés (études *in vitro*), suite à la production de plusieurs lots d'imogolites (Al/Ge, simples et doubles parois, plus ou moins longs...) ont montré que les précurseurs de tube (5 nm), les tubes très courts (15 nm environ) et courts (50 nm environ) ne présentaient qu'une faible cytotoxicité vis-à-vis des fibroblastes. Cette très faible cytotoxicité n'est, en revanche, pas liée aux modes de contact ou d'internalisation. Une différence de comportement est en revanche liée à la génotoxicité. Alors que précurseurs et tubes courts induisent une génotoxicité pour de faibles concentrations (internalisation), les tubes plus longs se révèlent moins génotoxiques. Ce résultat a été surprenant car la différence de taille entre tubes très courts et courts n'est pas si importante.

Si la génotoxicité est comparée non pas à la concentration en masse, mais au nombre de tubes ou de particules, alors les effets apparaissent aux mêmes nombres d'objets.

In vivo, nous avons montré pour la première fois que les imogolites SW et DW ne sont pas éliminés rapidement du poumon et induisent des réponses inflammatoires et fibrotiques dans un modèle expérimental après instillation intratrachéale.

Enfin, le dernier enjeu majeur consistait à synthétiser des tubes non pas de quelques dizaines de nm, mais d'atteindre des longueurs microniques. Il s'agissait du verrou majeur de ce projet. Aucune équipe n'avait été capable de réussir ce type de synthèse. Nous pouvons désormais proposer des imogolites Al/Si, Al/Ge, simple et double parois, dont les longueurs peuvent varier de 10 nm à plusieurs microns.

Conclusion

Le projet consistait à synthétiser des nanotubes d'imogolite micronique à forte concentration. Le projet a démontré que la croissance des nanotubes se fait par agrégation. La stratégie a donc consisté à maximiser la probabilité de rencontre et à augmenter l'efficacité du collage. Les premiers lots d'imogolite ont permis de tester quelques hypothèses sur les mécanismes de toxicité :

- *In vitro* : tous les essais de cytotoxicité sur différentes lignées cellulaires montrent une toxicité cellulaire de l'imogolite seulement à hautes concentrations
- *In vivo* : l'étude de la biopersistance chez le rat montre que 20% de la dose administrée persiste dans les poumons 60 jours après exposition. À noter que la réponse inflammatoire est dose dépendante 3 jours après l'administration des nanotubes.

Apports à l'évaluation ou à la gestion des risques sanitaires

La politique de gestion des risques des nanotechnologies n'est toujours pas clairement établie. Il reste en effet de nombreux verrous scientifiques, qu'il s'agisse de questions autour du niveau d'exposition réel ou de la dangerosité des nanomatériaux. Bien souvent, les auteurs s'accordent sur le fait qu'il serait capital de disposer de nanomatériaux modèles afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par différentes équipes.

Notre projet montre qu'il est désormais possible d'utiliser des nanotubes d'imogolite, simple ou double parois, de diamètre parfaitement contrôlé et de longueur variable de quelques nm jusqu'au micron. Ces objets dont la composition chimique est connue et ne varient pas, se révèlent suffisamment stables chimiquement pour lancer des études *in vitro*.

Projet PNR-EST réalisé entre décembre 2010 et juin 2013.

Mesure des effets toxicologiques de nano-oxydes métalliques sur cellules humaines *in vitro*

Romain GRALL¹, Vincent PAGET², Patricia HORCAJADA², Jean-Charles ARNAULT³, Sylvie CHEVILLARD¹

¹CEA, Fontenay-aux-Roses ; ²Institut Lavoisier, Versailles ; ³CEA, Saclay. Contact : sylvie.chevillard@cea.fr

Introduction

De plus en plus de produits commercialisés contiennent des nanoparticules, notamment des oxydes métalliques qui entrent entre autres dans la composition des semi-conducteurs, de colorants mais qui sont aussi prometteurs pour des applications médicales. Cependant, l'identification des dangers et l'évaluation des risques de ces nanoparticules, par les approches de toxicologie conventionnelle, ne sont actuellement pas envisageables à grande échelle dans la mesure où, faute de connaissances suffisantes, chaque nanoparticule doit être considérée comme singulière. C'est pourquoi nous avons étudié, par des approches *in vitro* à haut et moyen débits, la cytotoxicité *in vitro* de nanoparticules de TiO₂ et de nanoparticules métalliques mésoporeuses après exposition *in vitro* de lignées cellulaires humaines. De plus, l'inhalation étant une voie majeure de contamination, nous avons mis en place un modèle 3D de culture de cellules pulmonaires humaines.

Matériels et méthodes

Nous avons systématisé une batterie de tests pour mesurer la cytotoxicité, génotoxicité, stress oxydant, cassures de l'ADN et entrée des nanoparticules après exposition de lignées cellulaires humaines de foie et de poumon. En complément, l'analyse du transcriptome des cellules exposées devait nous renseigner sur les mécanismes d'action de ces nanoparticules une fois entrées dans les cellules, et donc devait nous aider à mieux comprendre les réponses cellulaires. Les partenaires physiciens de ce projet, et Patricia Horcajada (Institut Lavoisier) ont synthétisé et caractérisé les MILs (matériaux de l'Institut Lavoisier) et Jean-Charles Arnault (CEA LIST) a assuré avec notre équipe la caractérisation physico-chimique des nanoparticules dans l'eau et dans les milieux de culture cellulaire (en suivant parfaitement les recommandations de l'OCDE et celles émises par le consortium européen NanoReg1, dans lequel nous sommes partenaires). Nous avons aussi développé un système de culture tridimensionnelle à partir de la lignée pulmonaire A549

Résultats

MILS : Nous avons analysé la cytotoxicité et génotoxicité de MIL-100 (Fe), MIL-100 (Al) et MIL-100 (Cr), sur des lignées cellulaires pulmonaires (A549 et Calu-3) et hépatiques (HepG2 et Hep3B). Les MIL-100 (Fe, Al, Cr) n'ont pas induit de cytotoxicité, quels que soient les tests (même à fortes doses !) sur les lignées cellulaires présentant une protéine p53 sauvage (A549, Calu-3 et HepG2). Seul un effet toxique a été observé, après exposition à fortes doses de la lignée Hep3B avec les MIL100-Fe. Les cellules Hep3B sont particulièrement sensibles car elles expriment une protéine p53 non fonctionnelle.

TiO₂ : Nous montrons que le TiO₂ p25 n'induit pas de cytotoxicité sur la lignée pulmonaire A549 par contre il est cytotoxique à fortes doses sur les cellules Calu-3. De manière surprenante, l'analyse de la granulométrie des cellules et l'observation en microscopie confocale montrent que les nanoparticules entrent beaucoup plus dans les cellules A 549 que dans les cellules calu-3. La cytotoxicité observée sur les calu-3 est liée à une production significative de ROS.

Culture 3D : Les cellules A549 sont cultivées sur un filtre semi-poreux, placées à l'interface air – milieu nutritif liquide. Après environ deux mois de culture, les structures en 3D s'organisent et se différencient. Globalement, nous montrons que ces structures 3D se présentent comme un épithélium stratifié avec une différenciation pseudo alvéolaire.

Nous observons des invaginations cytoplasmiques ou pseudopodes qui assurent l'ancrage du nodule sur la membrane. Cet ancrage indique l'existence d'un pôle basal et d'un pôle apical. Une analyse en microscopie électronique a confirmé la présence des liaisons d'adhérence inter-cellulaires, de cellules de type glandulaire sécrétrices et de structures typiques de sécrétion de mucus.

Analyse du transcriptome : Nous montrons que les nanoparticules peuvent induire de gros biais dans l'analyse du transcriptome, notamment en raison d'une adsorption non spécifique sur les nanoparticules.

Conclusion

En conclusion, les MILs chrome et aluminium ne sont ni cytotoxiques ni génotoxiques sur quatre lignées testées. Le MIL fer n'est cytotoxique que sur la seule lignée p53 mutée (Hep3B). Globalement, ces trois particules à base de chrome, fer et aluminium ne sont pas cytotoxiques *in vitro* sur des cellules p53+, elles entrent bien dans les cellules et sont donc prometteuses pour des applications médicales. Les cellules Calu-3 sont plus sensibles que les cellules A549 vis-à-vis d'une exposition aux TiO₂ p25 en raison d'une production de ROS plus importante. L'analyse du transcriptome nous a permis de montrer un nouveau comportement singulier des nanoparticules et illustre parfaitement les précautions à prendre, notamment en ce qui concerne les interférences, avant de conclure sur les résultats d'un test. Concernant la culture 3D à l'interface air/liquide, nous avons mis au point une culture d'épithélium stratifié pulmonaire humain, différencié et sécrétant du mucus.

Apports à l'évaluation ou à la gestion des risques sanitaires

Ces résultats montrent à nouveau que le monde des nanoparticules est singulier, et que pour tester la cytotoxicité *in vitro*, il faut multiplier les tests biologiques et les modèles biologiques. Les interférences que nous avons observées entre les nanoparticules et les ARNm ont des conséquences importantes. Cette adsorption non spécifique des ARNs sur les nanoparticules peut biaiser considérablement les analyses, notamment pour les nombreuses équipes qui utilisent des logiciels commerciaux, avec lesquels de telles interférences passent totalement inaperçues. Par ailleurs, cette adsorption des ARNs sur les nanoparticules peut être « vue » comme une sorte de reprogrammation génétique dont il semble important de comprendre les conséquences pour interpréter les effets biologiques induits. Enfin, les cultures pulmonaires tridimensionnelles que nous avons développées sont très prometteuses pour les recherches en tox- nanotoxicologie dans la mesure où elles miment la différenciation de l'épithélium alvéolaire et sécrètent du surfactant humain.

Projet PNR-EST réalisé entre février 2012 et décembre 2014.

Partenaires du PNR-EST

