

Toxicité des silices amorphes synthétiques

AUTEURS :

Y. Guichard, A. Kirsch, département Toxicologie et biométrie, INRS.

EN RÉSUMÉ

Les silices amorphes synthétiques (SAS) sont des silices manufacturées sous forme nanoparticulaire. Leur production et utilisation importantes nécessitent de connaître le risque sanitaire pour les travailleurs exposés. Peu de données épidémiologiques sur leur toxicité pulmonaire sont disponibles, mais les résultats issus d'études *in vivo* après exposition par voie respiratoire et *in vitro* sur des cultures de cellules montrent que les SAS ont une activité toxique. De nombreux facteurs conditionnent celle-ci, en particulier la chronicité de l'exposition dans les études *in vivo*, le type cellulaire dans les essais *in vitro* et les variations de la chimie de surface des SAS. De plus, des informations sur leur bioaccumulation/biodisponibilité *in vivo* permettraient de mieux appréhender leur toxicité.

MOTS CLÉS

Silice /
Nanoparticule /
Risque
toxicologique /
Produit
chimique / Risque
chimique

L'objectif de cet article est de faire le point des connaissances sur la toxicité pulmonaire des silices amorphes synthétiques (SAS) à partir des études disponibles chez l'homme et des travaux expérimentaux *in vivo* et *in vitro*. L'importance des propriétés physico-chimiques des SAS dans les mécanismes de toxicité est également abordée. Les sources d'information qui ont été utilisées sont principalement les sites en ligne de Medline-PubMed, du Centre international de recherche sur le cancer et de l'*European Chemicals Agency*. Les articles sélectionnés concernent des SAS précipitées, colloïdales ou pyrogénées sur lesquelles ont été réalisées des études chez l'homme ou des études sur des modèles *in vivo* ou *in vitro*.

Les silices amorphes synthétiques (SAS) sont composées de particules primaires d'un diamètre généralement inférieur à 100 nanomètres (nm). Elles sont ainsi considérées comme des substances à l'état nanoparticulaire (ou nanomatériaux) selon l'article R. 523-12 du Code de l'environnement.

Les SAS peuvent être divisées en deux types selon leur procédé de fabrication : voie humide ou thermique (figure 1 page suivante). Les SAS précipitées sont obtenues par acidification du silicate de sodium (Na_2SiO_3) en conditions humides. Le précipité gélatineux qui en résulte est alors transformé en SAS sous forme de poudre, de gel ou de colloïde en fonction du séchage et du broyage employés. Les SAS pyrogénées sont produites sous forme de nanopoudre par hydrolyse de tétrachlorure de silicium (SiCl_4) à une température supérieure à 1 000 °C, tandis que les silices à l'arc sont obtenues par broyage. Les SAS précipitées et pyrogénées ont une forme plus ou moins sphérique avec un diamètre d'environ 10-20 nm et sont fortement agrégées/agglomérées entre elles (figure 2 page suivante). Toutes les formes de silices amorphes synthétiques peuvent être modifiées en surface, physiquement ou chimiquement.

Les produits industriels contenant des SAS ont été commercialisés pour la première fois dans les années 1950. En 2016, la production

Toxicité des silices amorphes synthétiques

Figure 1 : Production industrielle des SAS.

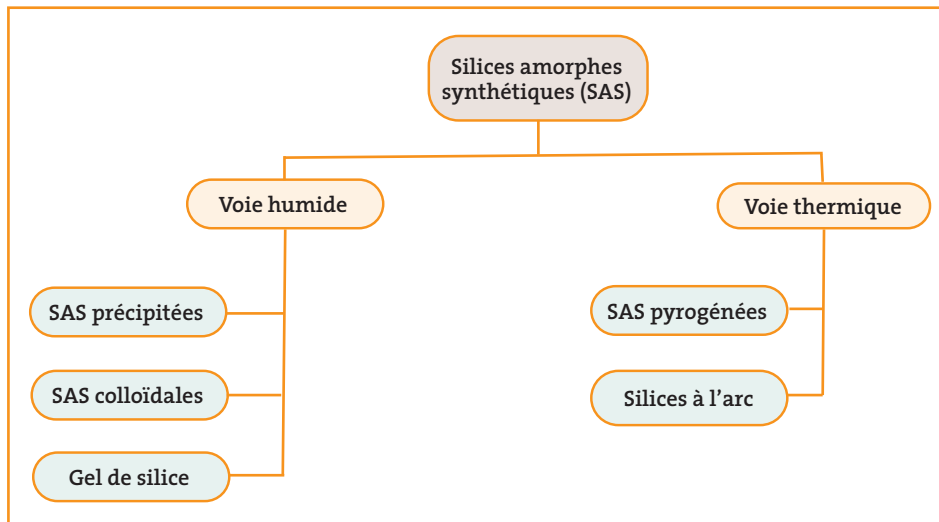
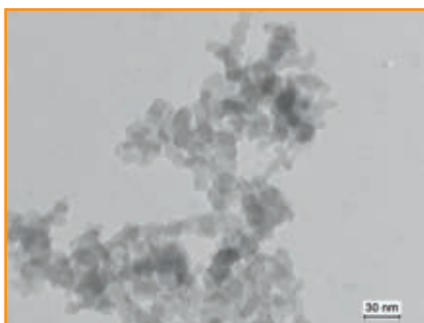
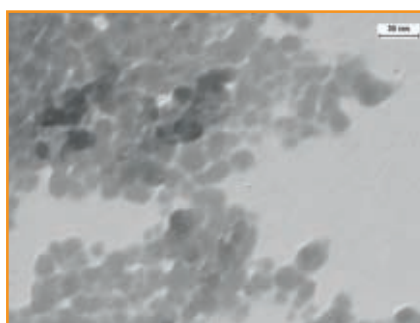


Figure 2 : Images, en microscopie électronique, de silices amorphes synthétiques (SAS).

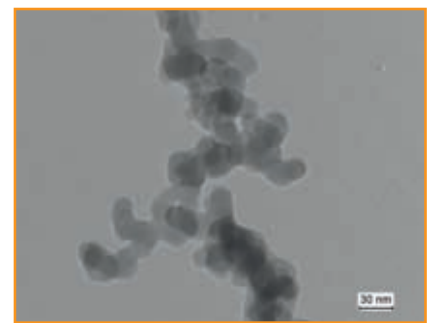
© Département Métrologie des polluants, Laboratoire d'Analyse Inorganique et de Caractérisation des Aérosols, INRS



SAS précipitée en poudre



SAS précipitée colloïdale



SAS pyrogénée

mondiale de SAS était estimée à 3,2 millions de tonnes par an [1]. D'après les données issues de la déclaration des substances à l'état nanoparticulaire mises sur le marché en France en 2018 (registre R-Nano), les SAS sont parmi les nanomatériaux les plus produits, distribués ou importés avec des quantités supérieures à 10 000 tonnes [2]. Les SAS sont utilisées dans une grande variété d'applications industrielles, notamment en tant qu'agents de renforcement et d'épaississement dans la fabrication des pneumatiques,

des résines et des encres. Elles se retrouvent aussi dans les produits cosmétiques, pharmaceutiques et sont utilisées comme additifs alimentaires.

D'un point de vue réglementaire, les SAS, ne font pas l'objet à ce jour d'une classification européenne harmonisée dans le cadre du règlement CLP.

Il n'existe pas actuellement en France de valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP) spécifique pour les formes nanoparticulaires de silice amorphe telles que les SAS. De par leur taille

nanométrique, elles ne peuvent pas être considérées comme des poussières réputées sans effet spécifique (PSES), comme le sont classiquement les silices amorphes naturelles, dont le diamètre particulaire est supérieur à 1 µm. De ce fait, l'utilisation des VLEP existantes pour les PSES [3] comme repère lors de l'évaluation des risques des SAS est inadaptée. En Allemagne, la valeur MAK spécifique à certaines SAS¹ est de 0,5 mg/m³ [4]. Il convient néanmoins de rappeler que, lors de la caractérisation des expositions

1. Silice pyrogénée (CAS 112945-52-5), silice synthétique produite par voie humide (précipitée, gel, CAS 7631-86-9).

>GLOSSAIRE (dans la suite de l'article, tous les termes accompagnés d'un astérisque* sont définis ici)

8-hydro-2'-désoxyguanosine : cette base modifiée se forme par l'oxydation de la base guanine de l'ADN. Elle peut entraîner des mutations de l'ADN et, à ce titre, peut être considérée comme un marqueur du stress oxydant*.

Apoptose (ou mort cellulaire programmée) : le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal.

Chimiokines : protéines dont l'une des fonctions principales est d'attirer les leucocytes sur le site inflammatoire.

Histone γ H2AX : forme phosphorylée de l'histone H2AX. La formation de cassures doubles brins de l'ADN déclenche un mécanisme cellulaire de réparation de l'ADN qui dépend de la phosphorylation de l'histone H2AX autour des sites de cassures. L'histone γ H2AX est

couramment utilisée comme marqueur de génotoxicité.

Lysosome : organite cellulaire contenant des enzymes qui dégradent la plupart des macromolécules biologiques.

Stress oxydant : provient d'une agression chimique oxydative due à un excès de molécules particulièrement nocives dans la cellule. Ces molécules, appelées espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, peuvent endommager l'ADN et l'ARN et oxyder les protéines et les lipides. Elles comprennent le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxyde nitrique (NO), l'anion oxyde O₂⁻, le peroxyde nitrite (ONOO⁻), l'acide hydrochloré (HOCl) et le radical hydroxyle (OH⁻).

Test des comètes : met en évidence les cassures de brins d'ADN dans le noyau des cellules. Après traitement, les cellules sont incorporées dans un gel d'agarose. Les fragments

d'ADN sont alors séparés par électrophorèse et marqués par fluorescence. La présence de cassures de l'ADN se traduit par une « queue de comète » figurant des fragments d'ADN de différentes tailles.

Test de mutagenèse HPRT : test de mutation génique *in vivo* ou *in vitro* sur des cellules de mammifères. Il est employé pour détecter des mutations induites par des agents chimiques. Dans ce test, les systèmes génétiques utilisés permettent de détecter les mutations dans le gène codant pour l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT) [7].

Test de cytotoxicité LDH : mesure l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) extracellulaire, un enzyme cytoplasmique qui s'échappe hors de la cellule si la membrane de celle-ci est altérée.

Test des micronoyaux : permet de détecter différents types d'altérations chromosomiques. Après traitement des cellules avec un agent génotoxique et marquage de l'ADN, l'observation de micronoyaux à proximité du noyau principal traduit la présence de fragments de chromosome ou de chromosome entier.

Test de transformation des cellules Bhas 42 : la transformation cellulaire est le processus de conversion de cellules normales en cellules tumorales. Après traitement, les cellules sont cultivées en boîte de pétri pendant 21 jours puis colorées. Les foyers apparaissant dans les cultures traitées sont constitués de cellules transformées qui ont proliféré de manière anarchique et qui sont plus intensément colorées que les cellules normales.

professionnelles aux nanoparticules, l'expression des doses uniquement en concentration massique peut ne pas être suffisante dans le cadre de l'évaluation des risques.

Comme les SAS peuvent être remises en suspension dans l'air lors de leur production ou de leur utilisation, la voie majeure d'exposition professionnelle à ces matériaux est l'inhalation [5]. Pour cette raison, cette revue de la littérature s'intéressera particulièrement à leurs effets pulmonaires chez l'homme et l'animal. En revanche, les modèles cellulaires étant souvent dépendants des effets toxiques recherchés, les études *in vitro* décrites dans cette revue ne concerneront pas exclusivement des modèles pulmonaires.

ÉTUDES CHEZ L'HOMME

Si les données expérimentales sont riches, comme montré ci-après, les données chez l'homme sont rares. Pour combler ce manque de données, des études épidémiologiques sont en cours et le suivi longitudinal des populations incluses permettra l'analyse des effets sanitaires des SAS. Ainsi, une cohorte prospective de travailleurs exposés à différents nanomatériaux, dont les SAS, a été mise en place à Taiwan en 2012 [6]. Le suivi à 6 mois de travailleurs manipulant des SAS a montré que cette exposition entraînait une diminution significative de l'enzyme antioxydante glutathion peroxydase et une augmentation des marqueurs cardiovasculaires

(molécules d'adhésion vasculaire et d'adhésion intercellulaire, variabilité des fréquences basses cardiaques). Au niveau de la fonction pulmonaire, la diminution du débit expiratoire forcé à 25 % était plus élevée chez les salariés exposés par rapport aux non exposés. Des effets génotoxiques ont été mis en évidence dans les lymphocytes circulants par le test des comètes*. Des effets épigénétiques, se traduisant par une hypométhylation globale de l'ADN des lymphocytes chez les travailleurs exposés aux SAS, ont été également observés. Ce marqueur est souvent associé aux stades précoces de la cancérogénèse bien qu'aucun effet cancérogène n'ait été observé dans les études épidémiologiques à ce jour [8]. Par ailleurs, une étude transversale

Toxicité des silices amorphes synthétiques

rétrospective réalisée chez des travailleurs de cinq usines exposés à des SAS pyrogénées et précipitées, a mis en évidence une diminution de la capacité vitale forcée, sans signe radiologique de silicose. La prévalence de troubles ventilatoires obstructifs et restrictifs chez les travailleurs était similaire à celle de la population générale [9]. À notre connaissance, il n'y a pas de donnée de toxicocinétique chez l'homme après exposition aux SAS par voie respiratoire.

Un état des lieux sur les données humaines en relation avec l'exposition aux SAS a été publié en 2019 [10].

ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

ÉTUDES *IN VIVO* (tableau I)

Plusieurs études de toxicité *in vivo* se sont intéressées aux effets des SAS après exposition par voie pulmonaire. En effet, les SAS sont capables de produire des effets inflammatoires pulmonaires comme d'autres agents particuliers ou fibreux le font. Les effets cancérigènes ou liés à la cancérogénèse tels que la génotoxicité ont été également étudiés *in vivo*. Une génotoxicité directe et indirecte (dite secondaire) des silices cristallines proposée comme mécanismes de leur toxicité a été étendue par la suite aux SAS [19]. La génotoxicité directe nécessite que les particules pénètrent dans le noyau et interagissent directement avec l'ADN, libérant des radicaux libres qui endommagent l'ADN ou perturbent la ségrégation des chromosomes pendant la mitose. La génotoxicité indirecte repose, quant à elle, sur l'épuisement des mécanismes antioxydants cellulaires dont les conséquences sont des dommages oxydatifs

endogènes à l'état d'équilibre, ou des dommages oxydatifs accrus résultant de l'activité mitochondriale, l'inhibition de la réparation de l'ADN... La génotoxicité secondaire (uniquement *in vivo*) est médiée par des espèces réactives de l'oxygène produites par les phagocytes lors de l'inflammation [20].

TOXICITÉ AIGUË

Une étude de toxicité aiguë dans laquelle des rats étaient exposés par instillation endotrachéale à 3, 6 et 12 mg/kg de SAS à 3h, 24h ou 48h avant la collecte des tissus, a permis de montrer que des SAS précipitées et pyrogénées induisent, à toutes les doses testées, une augmentation du nombre de granulocytes neutrophiles dans le liquide broncho-alvéolaire (LBA) indiquant une inflammation pulmonaire chez les animaux exposés. Dans cette étude, le test des comètes*, réalisé sur les cellules du poumon, du sang, de la rate, du foie, de la moelle osseuse, des reins, sur les cellules présentes dans le LBA, et le test des micronoyaux* appliqués aux cellules de la moelle osseuse, n'ont pas montré d'effet génotoxique des SAS étudiées [16]. Ainsi, contrairement à l'hypothèse proposée, l'inflammation constatée n'a pas initié un processus génotoxique.

L'exposition par inhalation de rats à des SAS précipitées et pyrogénées à 25 mg/m³ pendant 5 jours a conduit à des changements histopathologiques au niveau des poumons : des accumulations intra-alvéolaires de macrophages et de granulocytes ont été constatées ainsi qu'une hypertrophie bronchique [12]. En revanche, des expositions dont les conditions expérimentales étaient identiques à l'exception de la concentration : 1 et 5 mg/m³, n'ont pas provoqué les effets observés à 25 mg/m³.

TOXICITÉ SUBCHRONIQUE ET CHRONIQUE

Dans le cadre d'une étude de toxicité subchronique, l'exposition par inhalation de rats à différentes SAS, pendant 13 semaines, a provoqué une augmentation du poids des poumons à toutes les doses testées (1, 6 et 30 mg/m³). La dose la plus élevée (30 mg/m³) induisait une inflammation pulmonaire, des lésions granulomateuses, un épaississement des parois alvéolaires et une fibrose [11]. Cet effet inflammatoire des SAS a été confirmé dans une autre étude [21]. Le LBA des rats exposés par inhalation pendant 13 semaines à une concentration élevée d'une SAS pyrogénée à 50 mg/m³ contenait un nombre de granulocytes neutrophiles 200 fois supérieur à celui des témoins. Par ailleurs, l'expression du gène de la chimiokine* MIP-2 était accrue, témoignant d'une activation des neutrophiles et par là-même d'une inflammation pulmonaire induite par l'activation de ces cellules du système immunitaire. De manière intéressante, le nombre de neutrophiles et l'expression de MIP-2 revenaient à des valeurs normales huit mois après la fin de l'exposition, indiquant que l'inflammation pulmonaire produite par cette SAS était réversible. De plus, le test de cytotoxicité LDH*, réalisé sur le LBA des rats exposés aux SAS, indiquait un effet cytotoxique des SAS sur les cellules pulmonaires. Par rapport aux effets génotoxiques, le test de mutagenèse HPRT* n'avait pas mis en évidence une augmentation des mutations de l'ADN induite par cette SAS dans les cellules épithéliales alvéolaires [21]. Là encore, l'hypothèse d'une génotoxicité potentielle des SAS n'a pas été montrée expérimentalement. La première étude de cancérogénèse sur une SAS (précipitée) a été

↓ Tableau I

> ÉTUDES *IN VIVO*

Souche	Type de SAS	Taille	Dose	Voie d'exposition	Durée	Effets	Références
Rat Wistar	PC*	18 nm	30 mg/m ³	Inhalation	6 h/jour, 5 jours/semaine, 13 semaines	Inflammation pulmonaire	[11]
	PG**	12 nm	1, 6, 30 mg/m ³				
	PG	12 nm	30 mg/m ³				
Rat Wistar	PC	20 à 50 µm (AA***)	1, 5, 25 mg/m ³	Inhalation	6h/jour, 5 jours	Cytotoxicité et inflammation pulmonaire	[12]
	PG	100 µm (AA)					
Rat Wistar	PC	22 nm	477 mg/m ³	Inhalation	4 h, suivi sur 14 jours	Absence d'effets	[13]
Souris	PC	Non donnée	0,5 g par jour générés dans une chambre de 600 L. (Données de génération et caractérisation de l'aérosol difficilement exploitables)	Inhalation	1 an	Nodules fibreux dans les ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques ; Hypertrophie du tissu lymphatique dans le poumon et dans les ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques	[14]
Rat Sprague-Dawley	PC	1 à 3 µm (AA)	1 ou 5 mg/kg	Instillation endotrachéale	24h	Cytotoxicité et inflammation pulmonaire	[15]
Rat Sprague-Dawley	PC	18 nm	3, 6, et 12 mg/kg	Instillation endotrachéale	3h, 24h et 48h	Inflammation pulmonaire ; absence de cassures de l'ADN et de micronoyaux	[16]
	PC	18 nm					
	PG	17 nm					
	PG	24 nm					
Rat Wistar	PG	14 nm	10 x 3 mg/kg par semaine	Instillation endotrachéale	28 mois (total)	Tumeurs primaires pulmonaires	[17]
Rat Wistar	PG	14 nm	30 x 0,5 mg/kg toutes les 2 semaines	Instillation endotrachéale	29 mois (total)	Tumeurs primaires pulmonaires	[18]

*PC : précipitée ; PG** : pyrogénée ; AA*** : agrégats/agglomérats

réalisée chez la souris par inhalation et montrait une augmentation des tumeurs pulmonaires (adénomes et adénocarcinomes) chez les souris exposées. Par ailleurs, quelques nodules fibreux ont été retrouvés dans les ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques des souris exposées. L'exposition avait également entraîné une hypertrophie du tissu lymphatique dans le poumon et dans les ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques. Cependant, les caractérisations du matériau et de l'aérosol étaient incomplètes, ce qui rend l'interprétation des résultats difficile [14]. En revanche, deux études chez le rat

ont montré que des instillations endotrachéales répétées pendant toute leur vie d'une SAS pyrogénée (tableau I) augmentaient l'incidence des tumeurs primaires pulmonaires [17, 18].

En résumé, les SAS, administrées par inhalation ou par instillation endotrachéale chez la souris ou le rat, produisent des effets inflammatoires et cytotoxiques pulmonaires mais pas d'effets génotoxiques dans les deux études citées. Il n'en demeure pas moins que deux études par instillation endotrachéale ont montré qu'elles pourraient induire des effets cancérogènes à long terme au niveau pulmonaire.

ÉTUDES *IN VITRO*

(tableau II page suivante)

Plusieurs expérimentations étudiant la toxicité *in vitro* des SAS précipitées et pyrogénées ont montré des effets toxiques liés au stress oxydatif cellulaire. Celui-ci a été mis en évidence par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote intracellulaires. Ainsi, des SAS pyrogénées augmentent les quantités d'ERO dans des cellules fibroblastiques de poumons humains [29] et induisent la production d'ERO et d'oxyde nitrique dans des macrophages alvéolaires de souris [30]. Dans ces études, le stress oxydant* a été aussi mis en

Toxicité des silices amorphes synthétiques

↓ Tableau II

> COMPARAISON DES EFFETS *IN VITRO* INDUITS PAR DIFFÉRENTS TYPES DE SAS

Type de SAS	Type cellulaire	Cytotoxicité	Apoptose	Génotoxicité	Stress oxydant	Pro-inflammation	Transformation cellulaire	Références
Précipitée poudre	Fibroblaste pulmonaire de hamster chinois	✓	✓	✗	✗	n.a	n.a	[22]
	Fibroblaste de souris	✓	n.a	✗	n.a	n.a	✗	[23]
	Fibroblaste de souris transgénique contenant l'oncogène <i>ras</i>	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	✓	[24]
	Cellule épithéliale d'adénome alvéolaire humain/ Cellule de carcinome épidermique humain	✓	✓	n.a	✓	n.a	n.a	[25]
	Macrophage alvéolaire de souris	✓	n.a	n.a	✗	✓	n.a	[26]
Précipitée colloïde	Fibroblaste pulmonaire de hamster chinois/Cellule épithéliale d'adénome alvéolaire humain	✓	n.a	✓	n.a	n.a	n.a	[27]
Pyrogénée	Fibroblaste pulmonaire de hamster chinois	✓	✓	✓	✗	n.a	n.a	[22]
	Fibroblaste de souris transgénique contenant l'oncogène <i>ras</i>	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	✓	[24]
	Cellule intestinale d'adénocarcinome colique	✓	n.a	n.a	✗	n.a	n.a	[28]
	Macrophage alvéolaire de souris	✓	n.a	n.a	✗	✓	n.a	[26]

*✓ : positif ; ✗ : négatif ; n.a : non analysé.

évidence par la baisse du niveau de glutathion [31], l'augmentation de l'activité d'enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) [29] et la production de cytokines pro-inflammatoires [30]. De même, le traitement de cellules épithéliales d'adénomes alvéolaires humains (cellules A549) avec une SAS pyrogénée a augmenté l'expression de l'interleukine-8, une protéine intervenant dans la réponse pro-inflammatoire [32]. De plus, une induction d'apoptose* liée à un stress

oxydatif a été observée dans les cellules humaines (A549) traitées avec une SAS précipitée [25]. En revanche, l'effet sur le stress oxydant* des SAS pourrait dépendre de la lignée cellulaire. Ainsi, l'exposition de cellules fibroblastiques pulmonaires de hamster à des SAS pyrogénées ou précipitées a induit une apoptose* non accompagnée de production d'ERO intracellulaires [22].

Dans l'objectif d'évaluer le potentiel cancérogène des SAS, plusieurs études ont évalué les effets

génétoxicques des particules dans différentes lignées cellulaires pulmonaires. Les SAS induisent des cassures de brins d'ADN (évaluées par le test des comètes*) [22, 27, 33 à 35], la formation de micronoyaux [36], des mutations de l'ADN [37], la formation de la 8-hydro-2'-désoxyguanosine* dans l'ADN [33, 35] et la phosphorylation de l'histone H2AX en histone γ H2AX* [33, 36, 38]. Cependant, certaines études ont donné des résultats négatifs : des SAS pyrogénées et précipitées n'induisaient pas la formation de

micronoyaux dans une lignée cellulaire fibroblastique murine [23], ni dans des lymphocytes humains [39]. Parmi les tests *in vitro* qui permettent d'évaluer le potentiel cancérigène d'un agent chimique, le test de transformation cellulaire est particulièrement pertinent car celle-ci peut conduire à la formation de cellules tumorales. Une étude utilisant le test de transformation des cellules Bhas 42*, qui sont des fibroblastes de souris génétiquement modifiés contenant dans leur génome l'oncogène *v-Ha-ras*, a révélé que des SAS précipitées et pyrogénées étaient capables d'induire une transformation cellulaire [40]. Ces effets pourraient s'expliquer par des modifications précoces de l'expression de gènes et des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et l'adhésion cellulaire, la réparation de l'ADN et l'inflammation [24]. De plus, les SAS induisent dans les cellules Bhas 42 une activation de l'oncogène *c-myc* par des mécanismes épigénétiques. Cette activation pourrait également être un facteur de transformation [41]. Par ailleurs, des silices colloïdales induisent la transformation de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B conduisant à la formation de tumeurs chez des souris athymiques *nude* après injection sous-cutanée [42].

En résumé, les effets *in vitro* toxiques des SAS sont déterminés par le choix du type de cellules, du système de culture et des conditions d'essai [43]. De manière assez consensuelle, les études *in vitro* ont montré que les SAS peuvent induire un stress oxydatif cellulaire qui conduit à des phénomènes apoptotiques. Des effets à la fois génotoxiques et transformants des SAS ont été également mis en évidence dans certaines études, alertant sur leur potentiel cancérigène.

Compte tenu de la variabilité des résultats reportés dans la littérature à partir d'expérimentations *in vitro*, la cancérigénéité des SAS reste à être confirmée ou infirmée par des études *in vivo* de cancérigénéité à long terme.

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES SAS ET EFFETS TOXICOLOGIQUES

La taille nanométrique des SAS facilite leur pénétration à l'intérieur des cellules et leur passage à travers les barrières tissulaires naturelles, par exemple des alvéoles pulmonaires vers le sang. Les différences de caractéristiques physico-chimiques entre les SAS précipitées et les SAS pyrogénées sont dues principalement à leurs modes de production ; elles pourraient influencer leurs propriétés toxicologiques [44, 45]. Par exemple, les SAS précipitées induisent un stress oxydatif souvent associé à un effet cytotoxique, tandis que les SAS pyrogénées provoquent une cytotoxicité sans qu'un stress oxydatif ne soit détecté. Plusieurs études ont montré que les SAS pyrogénées sont biologiquement plus réactives que les SAS précipitées de même taille [26, 46]. Ces dernières sont de nature hydrophile, tandis que les SAS pyrogénées sont hydrophobes en raison de la déshydroxylation des groupes OH de surface pendant le processus de production [45]. Cette différence de la structure chimique à la surface des particules pourrait contribuer à différentes activités biologiques.

Par ailleurs, les réactions chimiques à la surface des SAS avec les milieux biologiques dépendent de la quantité et de la distribution spatiale relatives des groupements silanols de surface (=Si-OH ; =Si(OH)₂) et des ponts siloxanes (=Si-O-Si=) [47] (**figure 3 page suivante**). Les cycles siloxanes peuvent déclencher la

formation de radicaux hydroxyles qui pourraient avoir un rôle dans la toxicité des SAS pyrogénées. Les groupements silanols constituent également des sites réactionnels qui peuvent provoquer la désorganisation des membranes cellulaires ; ils ont aussi la capacité de rendre instables les membranes des lysosomes* des macrophages et des cellules épithéliales initiant ainsi des processus pro-inflammatoires. La réactivité de ces différents groupements chimiques à la surface des SAS peut être affectée par les impuretés chimiques et les enrobages recouvrant la surface des particules en fonction du procédé de production.

FUTURES RECHERCHES

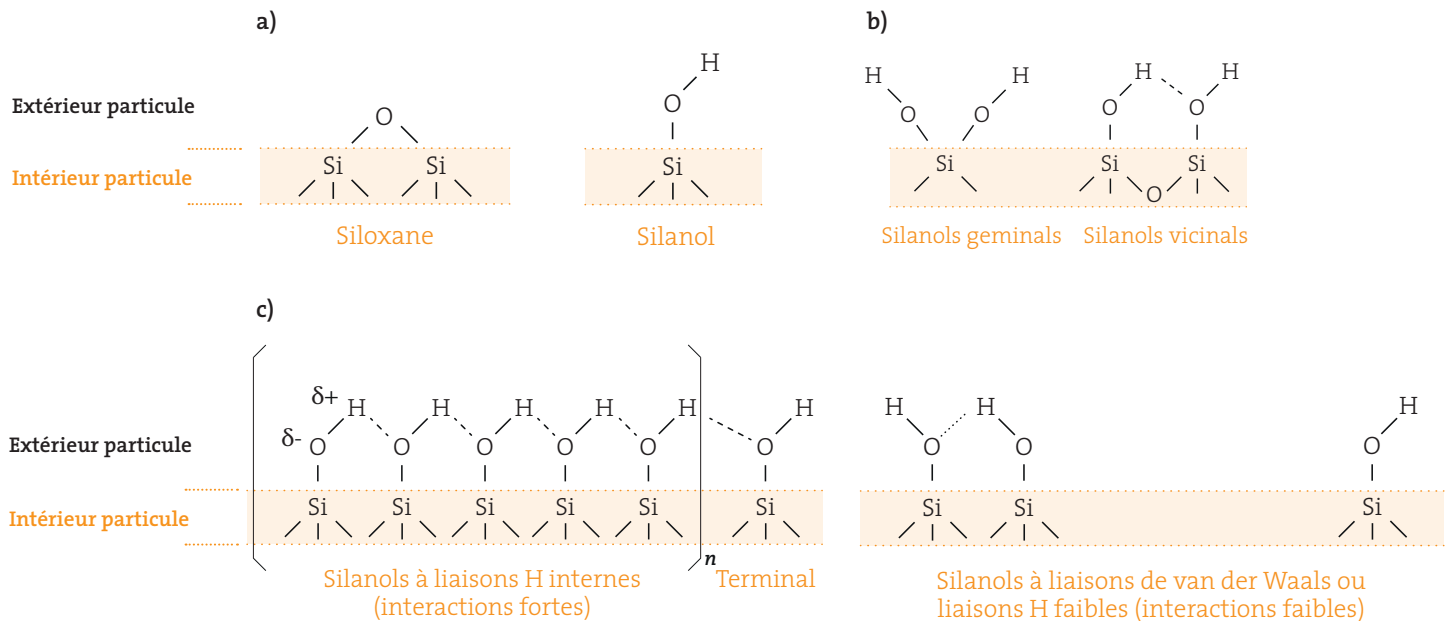
PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES ET TOXICITÉ

La plupart des études ont associé les paramètres toxiques à la taille des SAS [48], tandis que quelques-unes les ont associés à la porosité, à la forme, à la charge de surface et à la chimie de surface. En outre, la mesure du diamètre hydrodynamique des SAS montre qu'elles sont sous forme d'agrégats/agglomérats (AA) dans les milieux de culture cellulaire. La formation d'AA est également observée dans les matrices auxquelles l'homme peut être exposé telles que l'air, l'eau et les produits industriels. La formation d'AA modifie non seulement les caractéristiques générales des SAS, telles que la taille, la forme et la topologie de la surface, mais aussi potentiellement leurs propriétés toxiques [49, 50]. Bien que ces dernières années des progrès aient été réalisés dans la caractérisation des AA de SAS, leurs effets biologiques restent mal connus.

Toxicité des silices amorphes synthétiques

Figure 3 : Chimie de surface des silices amorphes synthétiques (SAS) [47].

a) Fonctionnalités chimiques à la surface de la silice ; b) types de silanols en fonction de leur position sur les atomes de Si ; c) types de silanols en fonction de leur distance mutuelle et de leur liaison.



MÉCANISMES COMMUNS DE TOXICITÉ DES SAS ET DES SILICES CRISTALLINES

Les dommages oxydatifs à l'ADN et aux membranes cellulaires ont été signalés comme les principaux mécanismes de toxicité impliqués dans les effets sur la santé des silices cristallines de taille micro-métrique, mais ces effets ont été également observés avec des SAS précipitées. Celles-ci possèdent des silanols en surface tandis que les SAS pyrogénées contiennent principalement des siloxanes [45]. De plus, des études récentes ont montré que la présence de groupements chimiques de surface, tels que les silanols, détermine davantage la toxicité des silices cristallines que la cristallinité en tant que telle [51]. Ainsi, les silanols pourraient être une caractéristique de surface commune des SAS précipitées et des silices cristallines, ce qui

pourrait rapprocher les activités toxicologiques de ces deux matériaux. La toxicité induite par les SAS pyrogénées pourrait également dépendre d'autres mécanismes que le stress oxydatif, mais ces derniers ne sont pas encore identifiés [28].

COMPARAISON ENTRE LA GÉNOTOXICITÉ IN VITRO ET IN VIVO

Bien que les SAS soient capables de provoquer des cassures double brin de l'ADN et des micronoyaux dans des conditions *in vitro*, aucun effet génotoxique de ce type n'a été observé *in vivo*, même chez des animaux exposés à des doses élevées. Ce constat pourrait être expliqué par le fait, comme pour les agents chimiques en général, que les SAS atteignent plus efficacement leurs cibles biologiques dans des cellules en culture que chez un animal

entier. Ainsi, un effet génotoxique observé *in vitro* n'est pas toujours transposable *in vivo*. Néanmoins, les essais *in vitro* restent pertinents dans la caractérisation du danger et le criblage d'un grand nombre d'agents chimiques ; il n'en demeure pas moins que les agents suspectés doivent être testés par une investigation complémentaire *in vivo* et confrontés aux études disponibles chez l'homme.

LIMITATION DU RISQUE ASSOCIÉ AUX SAS DÈS LEUR CONCEPTION

Les données *in vitro* suggèrent que la taille et la surface spécifique des SAS influent sur leur effet pro-inflammatoire [48]. La charge à la surface des particules jouerait un rôle non négligeable puisque la baisse des charges négatives diminue la réponse inflammatoire. La porosité est un autre facteur crucial

influençant leur interaction avec les molécules biologiques : plus les SAS sont poreuses, moins elles sont capables d'induire l'hémolyse des globules rouges [52]. Ainsi, la taille, la surface spécifique, la réactivité de surface et la porosité sont des paramètres à prendre en compte pour fabriquer des SAS moins toxiques et moins inflammatoires.

CONCLUSION

La production et l'utilisation importantes des SAS incitent à maîtriser le risque pour la santé encourue par les salariés qui y sont exposés. Des études épidémiologiques réalisées sur des sites de production ont montré des altérations de certains biomarqueurs d'effet associées à l'exposition à des SAS. Néanmoins, les données sont peu nombreuses et la toxicité chronique des SAS en situation d'exposition professionnelle reste imparfaitement caractérisée.

En revanche, il ressort des études *in vivo* que les SAS pyrogénées et précipitées peuvent induire, chez le rat, une inflammation pulmonaire transitoire, sans induire de fibrose pulmonaire contrairement aux silices cristallines micrométriques. Par ailleurs, il n'y a pas de preuve que les SAS produisent des effets génotoxiques chez le rat et seulement deux études *in vivo* ont montré la capacité d'une SAS pyrogénée à augmenter l'incidence de tumeurs pulmonaires chez le rat. D'autres études de cancérogénèse par inhalation sont sans doute nécessaires pour confirmer ou pas la cancérogénicité pulmonaire des SAS.

Les approches *in vitro* ont montré que des SAS peuvent induire un stress oxydatif, des phénomènes

apoptotiques, des effets génotoxiques et une transformation cellulaire dans différents modèles. Cependant, ces effets n'apparaissent pas systématiquement. À ce jour, les données de toxicité expérimentale sur les SAS restent parcellaires et sont encore insuffisantes pour statuer sur leur danger. Des investigations *in vivo* qui étudient la bioaccumulation/biodisponibilité des SAS permettraient d'améliorer les connaissances sur les effets à long terme de telles expositions. En outre, la physico-chimie des SAS est un paramètre dont le rôle toxique reste à préciser. En effet, si les groupements de surface tels que les silanols et les siloxanes sont spécifiques du processus de production des SAS, ils semblent jouer un rôle déterminant dans leur toxicité. De plus, la formation d'agrégats/agglomérats qui est un processus dynamique dans les milieux physiologiques pourrait également modifier leur toxicité. Par conséquent, une connaissance précise des liens entre les paramètres physico-chimiques et la toxicité permettrait une conception de SAS potentiellement moins dangereuse pour la santé, à la lumière de l'approche *safer by design*.

Bien que les SAS ne fassent pas l'objet d'une réglementation européenne pour classer les risques inhérents à leurs effets sur la santé, quelques études chez les travailleurs suggèrent qu'elles ne sont pas sans danger pour la santé. Les études expérimentales ont aussi démontré qu'elles peuvent provoquer des effets nocifs à court ou à long terme, probablement liés à leur nature nanoparticulaire et à leur chimie de surface. L'effet cancérogène des SAS reste à être élucidé, notamment en réalisant d'autres études de cancérogénèse

chez l'animal de laboratoire par voie respiratoire.

Dans ce contexte, il est nécessaire de rester vigilant sur les mesures de prévention à mettre en œuvre.

POINTS À RETENIR

- Les nanoparticules de silice amorphes synthétiques (SAS) existent principalement sous formes précipitées et pyrogénées.
- Elles sont produites en grandes quantités depuis plusieurs décennies et sont utilisées dans de nombreuses applications industrielles.
- Les données épidémiologiques restent insuffisantes pour évaluer le risque des SAS pour la santé humaine.
- Les SAS peuvent induire par voie respiratoire des effets inflammatoires pulmonaires transitoires chez le rat.
- Une SAS pyrogénée a augmenté l'incidence des tumeurs pulmonaires chez le rat.
- Les SAS peuvent induire du stress oxydatif, de l'apoptose*, des effets génotoxiques et la transformation cellulaire sur des lignées cellulaires.
- La toxicité des SAS dépendrait, en plus de leur taille nanométrique, de la structure et de la composition chimique de leur surface.
- Aujourd'hui, il n'est pas encore possible d'établir un lien entre les propriétés physico-chimiques des différents SAS et leur biodisponibilité et leur toxicité chez l'homme.

Toxicité des silices amorphes synthétiques

BIBLIOGRAPHIE

- 1 | Silices synthétiques. L'élémentarium, 2020 (<https://lelementarium.fr/product/silices-synthetiques/>).
- 2 | Déclarations des substances à l'état nanoparticulaire. Mise à disposition du public des éléments issus des déclarations. Bilan 2019 des déclarations des substances importées, fabriquées ou distribuées en France en 2018. Rapport d'étude 2019. Ministère de la Transition écologique ; 2019 : 304 p. (<https://www.r-nano.fr/>).
- 3 | Valeurs limites d'exposition en milieu professionnel. Les poussières dites sans effet spécifique (effets sanitaires). Avis de l'ANSES. Rapport d'expertise collective. ANSES, 2019 (<https://www.anses.fr/fr/system/files/VSR2017SA0148Ra.pdf>).
- 4 | List of MAK and BAT Values 2021. Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. Report 57, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), 2021 (https://www.dfg.de/en/service/press/press_releases/2021/press_release_no_23/index.html).
- 5 | Les silices amorphes synthétiques. Édition INRS ED 132. Paris : INRS ; 2022 : 6 p.
- 6 | LIU SH, TSOU TC, WANG SL, LI LA ET AL. - Epidemiological study of health hazards among workers handling engineered nanomaterials. *J Nanopart Res.* 2012 ; 14 (878) : 10.1007/s11051-012-0878-5.
- 7 | Essai n° 476: Essai *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifères utilisant les gènes Hprt et xprt. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4: Effets sur la santé. OCDE, 2016 (<https://www.oecd.org/fr/env/ess/essais/essai-n-476-essais-in-vitro-de-mutation-genique-sur-cellules-de-mammiferes-utilisant-les-genes-hprt-et-xprt-9789264264816-fr.htm>).
- 8 | LIAO HY, CHUNG YT, LAI CH, WANG SL ET AL. - Six-month follow-up study of health markers of nanomaterials among workers handling engineered nanomaterials. *Nanotoxicology.* 2014 ; 8 Suppl 1 : 100-10.
- 9 | TAEGER D, MCCUNNEY R, BAILER U, BARTHEL K ET AL. - Cross-Sectional Study on Nonmalignant Respiratory Morbidity due to Exposure to Synthetic Amorphous Silica. *J Occup Environ Med.* 2016 ; 58 (4) : 376-84.
- 10 | RADAUCEANU A, GUICHARD Y, GRZEBYK M - Toxicité des silices amorphes nanostructurées : état des connaissances et intérêt des biomarqueurs d'effets précoces dans la recherche. Mise au point TP 36. *Réf Santé Trav.* 2019 ; 160 : 163-74.
- 11 | REUZEL PG, BRUJNTJES JP, FERON VJ, WOUTERSEN RA - Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats. *Food Chem Toxicol.* 1991 ; 29 (5) : 341-54.
- 12 | ARTS JHE, MUUSER H, DUISTERMAAT E, JUNKER K ET AL. - Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months. *Food Chem Toxicol.* 2007 ; 45 (10) : 1856-67.
- 13 | LEWINSON J, MAYR W, WAGNER H - Characterization and toxicological behavior of synthetic amorphous hydrophobic silica. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1994 ; 20 (1 Pt 1) : 37-57.
- 14 | CAMPBELL JA - Effects of Precipitated Silica and of Iron Oxide on the Incidence of Primary Lung Tumours in Mice. *Br Med J.* 1940 ; 2 (4156) : 275-80.
- 15 | SAYES CM, REED KL, WARHEIT DB - Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci.* 2007 ; 97 (1) : 163-80.
- 16 | GUICHARD Y, MAIRE MA, SÉBILLAUD S, FONTANA C ET AL. - Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 2: intratracheal instillation and intravenous injection. *Environ Mol Mutagen.* 2015 ; 56 (2) : 228-44.
- 17 | POTT F, ROLLER M - Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur J Oncol.* 2005 ; 10 (4) : 249-81.
- 18 | KOLLING A, ERNST H, RITTINGHAUSEN S, HEINRICH U - Relationship of pulmonary toxicity and carcinogenicity of fine and ultrafine granular dusts in a rat bioassay. *Inhal Toxicol.* 2011 ; 23 (9) : 544-54.
- 19 | YAZDIMAMAGHANI M, MOOS PJ, DOBROVOLSKAIA MA, GHANDEHARI H - Genotoxicity of amorphous silica nanoparticles: Status and prospects. *Nanomedicine.* 2019 ; 16 : 106-25.
- 20 | BORM PJA, FOWLER P, KIRKLAND D - An updated review of the genotoxicity of respirable crystalline silica. *Part Fibre Toxicol.* 2018 ; 15 (1) : 23.
- 21 | JOHNSTON CJ, DRISCOLL KE, FINKELSTEIN JN, BAGGS R ET AL. - Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol Sci.* 2000 ; 56 (2) : 405-13.
- 22 | GUICHARD Y, FONTANA C, CHAVINIER E, TERZETTI F ET AL. - Cytotoxic and genotoxic evaluation of different synthetic amorphous silica nanomaterials in the V79 cell line. *Toxicol Ind Health.* 2016 ; 32 (9) : 1639-50.
- 23 | UBOLDI C, GIUDETTI G, BROGGI F, GILLILAND D ET AL. - Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutat Res.* 2012 ; 745 (1-2) : 11-20.
- 24 | KIRSCH A, DUBOIS-POTSCHNEIDER H, FONTANA C, SCHOHN H ET AL. - Predictive early gene signature during mouse Bhas 42 cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles. *Chem Biol Interact.* 2020 ; 315 : 108900.
- 25 | AHAMED M - Silica nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured A431 and A549 cells. *Hum Exp Toxicol.* 2013 ; 32 (2) : 186-95.
- 26 | DI CRISTO L, MOVIA D, BIANCHI MG, ALLEGRI M ET AL. - Proinflammatory Effects of Pyrogenic and Precipitated Amorphous Silica Nanoparticles in Innate Immunity Cells. *Toxicol Sci.* 2016 ; 150 (1) : 40-53.
- 27 | MASER E, SCHULZ M, SAUER UG, WIEMANN M ET AL. - In vitro and in vivo genotoxicity

- investigations of differently sized amorphous SiO₂ nanomaterials. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 ; 794 : 57-74.
- 28 | GEHRKE H, FRÜHMESSER A, PELKA J, ESSELEN M ET AL. - In vitro toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology*. 2013 ; 7 (3) : 274-93.
- 29 | ATHINARAYANAN J, PERIASAMY VS, ALSAIF MA, AL-WARTHAN AA ET AL. - Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells. *Cell Biol Toxicol*. 2014 ; 30 (2) : 89-100.
- 30 | GAZZANO E, GHIAZZA M, POLIMENI M, BOLIS V ET AL. - Physicochemical determinants in the cellular responses to nanostructured amorphous silicas. *Toxicol Sci*. 2012 ; 128 (1) : 158-70.
- 31 | AHMAD J, AHAMED M, AKHTAR MJ, ALROKAYAN SA ET AL. - Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 ; 259 (2) : 160-68.
- 32 | PANAS A, COMOUTH A, SAATHOFF H, LEISNER T ET AL. - Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air-liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014 ; 5 : 1590-602.
- 33 | GONG C, TAO G, YANG L, LIU J ET AL. - The role of reactive oxygen species in silicon dioxide nanoparticle-induced cytotoxicity and DNA damage in HaCaT cells. *Mol Biol Rep*. 2012 ; 39 (4) : 4915-25.
- 34 | HASHIMOTO M, IMAZATO S - Cytotoxic and genotoxic characterization of aluminum and silicon oxide nanoparticles in macrophages. *Dent Mater*. 2015 ; 31 (5) : 556-64.
- 35 | NABESHI H, YOSHIKAWA T, MATSUYAMA K, NAKAZATO Y ET AL. - Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Part Fibre Toxicol*. 2011 ; 8 : 1.
- 36 | TARANTINI A, LANCELEUR R, MOUROT A, LAVAULT MT ET AL. - Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line. *Toxicol In Vitro*. 2015 ; 29 (2) : 398-407.
- 37 | DEMIR E, CASTRANOVA V - Genotoxic effects of synthetic amorphous silica nanoparticles in the mouse lymphoma assay. *Toxicol Rep*. 2016 ; 3 : 807-15.
- 38 | SERGENT JA, PAGET V, CHEVILLARD S - Toxicity and genotoxicity of nano-SiO₂ on human epithelial intestinal HT-29 cell line. *Ann Occup Hyg*. 2012 ; 56 (5) : 622-30.
- 39 | TAVARES AM, LOURO H, ANTUNES S, QUARRÉ S ET AL. - Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol In Vitro*. 2014 ; 28 (1) : 60-69.
- 40 | FONTANA C, KIRSCH A, SEIDEL C, MARPEAUX L ET AL. - In vitro cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2017 ; 823 : 22-27.
- 41 | SEIDEL C, KIRSCH A, FONTANA C, VISVIKIS A ET AL. - Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation. *Nanotoxicology*. 2017 ; 11 (7) : 923-35.
- 42 | GUO C, WANG J, YANG M, LI Y ET AL. - Amorphous silica nanoparticles induce malignant transformation and tumorigenesis of human lung epithelial cells via P53 signaling. *Nanotoxicology*. 2017 ; 11 (9-10) : 1176-94.
- 43 | MURUGADOSS S, LISON D, GODDERIS L, VAN DEN BRULE S ET AL. - Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Arch Toxicol*. 2017 ; 91 (9) : 2967-3010.
- 44 | FRUJTIER-PÖLLOTH C - The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica-a nanostructured material. *Toxicology*. 2012 ; 294 (2-3) : 61-79.
- 45 | NAPIERSKA D, THOMASSEN LCJ, LISON D, MARTENS JA ET AL. - The nanosilica hazard: another variable entity. *Part Fibre Toxicol*. 2010 ; 7 (1) : 39.
- 46 | ZHANG H, DUNPHY DR, JIANG X, MENG H ET AL. - Processing pathway dependence of amorphous silica nanoparticle toxicity: colloidal vs pyrolytic. *J Am Chem Soc*. 2012 ; 134 (38) : 15790-804.
- 47 | PAVAN C, DELLE PIANE M, GULLO M, FILIPPI F ET AL. - The puzzling issue of silica toxicity: are silanols bridging the gaps between surface states and pathogenicity? *Part Fibre Toxicol*. 2019 ; 16 (1) : 32.
- 48 | DONG X, WU Z, LI X, XIAO L ET AL. - The Size-dependent Cytotoxicity of Amorphous Silica Nanoparticles: A Systematic Review of in vitro Studies. *Int J Nanomedicine*. 2020 ; 15 : 9089-113.
- 49 | LUYTS K, NAPIERSKA D, NEMERY B, HOET PHM - How physico-chemical characteristics of nanoparticles cause their toxicity: complex and unresolved interrelations. *Environ Sci Process Impacts*. 2013 ; 15 (1) : 23-38.
- 50 | DRESCHER D, ORTS-GIL G, LAUBE G, NATTE K ET AL. - Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects. *Anal Bioanal Chem*. 2011 ; 400 (5) : 1367-73.
- 51 | TURCI F, PAVAN C, LEINARDI R, TOMATIS M ET AL. - Revisiting the paradigm of silica pathogenicity with synthetic quartz crystals: the role of crystallinity and surface disorder. *Part Fibre Toxicol*. 2016 ; 13 (1) : 32.
- 52 | MAURER-JONES MA, LIN YS, HAYNES CL - Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano*. 2010 ; 4 (6) : 3363-73.