



**HAL**  
open science

# Évaluation de l'impact des nanoparticules et de l'aluminium sur la fonction de reproduction masculine

Jean-Philippe Klein

► **To cite this version:**

Jean-Philippe Klein. Évaluation de l'impact des nanoparticules et de l'aluminium sur la fonction de reproduction masculine. Physiologie [q-bio.TO]. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2015. Français. NNT: 2015STET005T . tel-01547234

**HAL Id: tel-01547234**

**<https://theses.hal.science/tel-01547234>**

Submitted on 26 Jun 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THESE

Présentée devant l'Université Jean Monnet – Saint-Etienne

Ecole Doctorale – Science, Ingénierie, Santé

Pour l'obtention du **DIPLOME DE DOCTORAT**

Discipline : Biologie et Physiologie

Par **Jean-Philippe Klein**

**EVALUATION DE L'IMPACT DES NANOPARTICULES ET DE  
L'ALUMINIUM SUR LA FONCTION DE REPRODUCTION  
MASCULINE**

Présentée et soutenue publiquement le 20 octobre 2015

<b>Jury :</b>	Pr Romain Gherardi	Rapporteur
	Pr Catherine Poirot	Rapporteur
	Pr Michèle Cottier	Directeur de Thèse
	Pr Olivier Tillement	Examinateur
	Dr Valérie Forest	Examinatrice
	Dr Jérémie Pourchez	Examinateur

*« It's not all their fault. To be honest, at some point, it doesn't even matter whose fault it is. Because it's always your responsibility. So if it's a big hole, start climbing »*

Mark Manson

*« Avoir la sagesse nécessaire de prendre un peu tout à la légère »*

Le petit prince





## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, le Pr Michèle Cottier pour votre soutien indéfectible, vos valeurs et vos précieux conseils tout au long de cette thèse. Votre rencontre a été décisive dans mon choix d'embrasser cette carrière hospitalo-universitaire et même si tout n'a pas toujours été simple, je vous en suis infiniment reconnaissant.

Je tiens également à remercier mes coencadrantes le Dr Delphine Boudard et le Dr Valérie Forest. Merci pour vos conseils et votre patience.

Je remercie tout particulièrement le Dr Lara Leclerc et Dimitrios Bitounis. Sans vous deux, je n'y serai pas arrivé. Lara, par ton courage et ton efficacité et Dimitri par ton ingéniosité et l'élégance de ton travail, vous m'avez tous deux donné une belle leçon d'humilité. J'espère un jour faire preuve d'autant de compétence dans le domaine de la recherche. Merci pour tout !

Je remercie tous les membres de l'équipe du LINA pour leur aide précieuse en particulier le Dr Jérémie Pourchez, Valérie Bin et Gwendoline Sarry qui m'ont accordé leur temps et leurs conseils.

Je voudrais également remercier tous les autres doctorants du LINA pour leur aide et leurs conseils, tout particulièrement Andréa pour son écoute et son soutien mais aussi Agathe, Gabriele, Mélanie et Clément. Je remercie aussi tous les autres doctorants qui m'ont transmis leur motivation et leur bonne humeur tout au long de ces cinq années : Clotilde, Zhiguo, Nelly, Aurélien, Giacomo, Fiona, Jules, Antoine, Binh Minh, Baptiste, Laura, Estelle et tous ceux dont le nom mériterait de figurer ici mais que ma mémoire défaillante n'a pas pu rappeler à mon esprit au moment où j'écrivais ces lignes.

Je remercie tous les gens du laboratoire d'histologie-embryologie et particulièrement tous ceux de l'équipe de BDR qui m'ont aidé à recueillir les prélèvements nécessaires à ce travail et m'ont dégagé du temps pour que je puisse le mener à bien.

Je remercie les équipes avec lesquels nous avons collaboré et tout particulièrement les équipes du Pr Romain Gherardi, du Pr Olivier Tillement et du Pr Chris Exley qui ont tous à leur tour contribué à la réussite de ce travail.

Je remercie l'association AIRE qui a financé une partie de ces travaux.

Je remercie enfin les membres du Jury d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail, particulièrement le Pr Catherine Poirot et le Pr Romain Gherardi qui en sont les rapporteurs.

D'un point de vue plus personnel, je remercie mes parents qui ont toujours été là pour moi, qui m'ont soutenu envers et contre tout dans tous mes choix et que la distance ne me permet pas de voir aussi souvent que je le souhaiterais. Puissè-je un jour rendre à mes enfants tout ce que vous avez fait pour moi.

A ma famille et en particulier à ma sœur, toujours si proche et si aimante !

Merci à Elise, nous avons grandi ensemble et connu de très beaux moments, je te souhaite beaucoup de bonheur.

A mes amis, et parce qu'une thèse n'est pas toujours un long fleuve tranquille je tiens à remercier en particulier ceux qui m'ont soutenu dans les moments les plus durs de ce parcours. Je pense notamment à Philippe, Stéphanie, Mélanie, Géraldine, Maëlle, Clotilde, Sébastien et Céline, Daniel et Laetitia, Michel et Magalie, Andréa et Aurélien, Cateline, Marie, Lara, Denis, Claire-Lise, Stéphanie, Magali, Amélie, Cindy et tous ceux qui par leurs mots ou leur présence ont su consoler mes peines. Je me rends compte à quel point j'ai de la chance de connaître autant de gens formidables. Merci encore d'avoir été là quand il le fallait.

Enfin, merci Corinne de m'avoir prêté un petit coin de ton bureau. J'espère que nous le partagerons encore longtemps. Très longtemps...

# SOMMAIRE

Remerciements .....	3
Sommaire .....	5
Table des illustrations.....	9
Table des tableaux.....	13
Glossaire des abréviations.....	14

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1	Introduction.....	18
2	Evolution de la fertilité masculine.....	21
2.1	La fertilité masculine baisse-t-elle vraiment ? .....	21
2.2	La situation en France .....	23
2.3	La situation dans le monde .....	25
2.4	Les causes d'une diminution de la fertilité masculine .....	26
2.4.1	Risques et problèmes posés par les expositions multiples .....	27
3	La fonction de reproduction masculine .....	29
3.1	Organisation morphologique et fonctionnelle de l'appareil reproducteur masculin .....	29
3.1.1	Histologie du testicule .....	30
3.1.2	Spermatogenèse (fonction exocrine du testicule) .....	35
3.1.3	Le contrôle hormonal de la fonction de reproduction masculine.....	37
3.2	Exploration de la fonction de reproduction masculine.....	39
3.2.1	Difficultés liées à l'évaluation de la fertilité chez l'homme.....	39
3.2.2	Examens permettant d'évaluer les caractéristiques spermatiques .....	40
4	Impact des nanomatériaux sur la fonction de reproduction masculine .....	43
4.1	Les nanomatériaux .....	43
4.1.1	Les nano-objets .....	43
4.1.2	Les matériaux nanostructurés.....	44
4.1.3	Nanomatériaux manufacturés et particules ultra-fines.....	44

4.2	Applications et exposition aux nanomatériaux.....	45
4.3	Toxicité des nanomatériaux .....	46
4.3.1	Toxicité humaine des nanomatériaux .....	46
4.3.2	Paramètres physicochimiques influant sur la toxicité des nanomatériaux .....	48
4.4	Réglementation .....	49
4.5	Biodistribution, biopersistance et toxicité testiculaire des nanomatériaux .....	50
4.5.1	Biodistribution testiculaire des nanomatériaux.....	51
4.5.2	Franchissement de la barrière hémato-testiculaire.....	57
4.5.3	Biopersistance testiculaire des nanoparticules.....	61
4.5.4	Biotoxicité testiculaire des nanoparticules .....	63
5	Impact de l'aluminium sur la fonction de reproduction masculine .....	81
5.1	L'aluminium.....	81
5.2	Applications et exposition à l'aluminium .....	82
5.2.1	L'alimentation.....	82
5.2.2	La cosmétique.....	83
5.2.3	La médecine.....	84
5.2.4	Contamination de l'air et de l'eau.....	85
5.2.5	Conclusions concernant l'exposition à l'aluminium .....	86
5.3	Toxicité de l'aluminium .....	86
5.3.1	Atteintes neurologiques .....	87
5.3.2	Atteintes immunologiques .....	87
5.3.3	Atteintes osseuses.....	88
5.3.4	Cancer.....	88
5.4	Reprotoxicité masculine de l'aluminium.....	89
6	Détection des éléments chimiques et des nanoparticules dans les milieux biologiques .....	94
6.1	Techniques de détection des éléments chimiques. ....	94
6.1.1	Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA) .....	94
6.1.2	Inductively Coupled Plasma and Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) .....	96

6.2	Techniques de détection des nanoparticules.....	98
6.2.1	La diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	98
6.2.2	Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	100
6.2.3	Microscopie Electronique en Transmission (MET) .....	103
6.2.4	Microanalyse X .....	105
6.3	Application à la détection des nanoparticules dans les tissus et liquides biologiques humains, limites et perspectives.....	105
<b>PARTIE EXPÉRIMENTALE</b>		
7	Etudes de biodistribution sur modèle animal .....	150
7.1	Biodistribution testiculaire de particules de latex fluorescentes de 450 nm après injection intramusculaire chez la souris.....	150
7.2	Biodistribution testiculaire de nanoparticules de silice à cœur d'or fluorescentes de 70 nm après injection intramusculaire chez la souris.....	162
8	Etudes cliniques.....	175
8.1	Mise au point d'une technique de détection des nanoparticules dans le sperme humain	175
8.1.1	Extraction des nanoparticules et analyse en diffusion dynamique de la lumière.....	176
8.1.2	Retrait du matériel biologique et analyse en DLS, ICP-AES et microscopie électronique à balayage.....	185
8.2	Charge aluminique du sperme humain : impact sur les paramètres spermatiques .....	208
<b>DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>		
9	Discussion .....	216
9.1	Synthèse des résultats et de la littérature .....	216
9.1.1	Impact des nanomatériaux sur la fonction de reproduction masculine .....	216
9.1.2	Impact de l'aluminium sur la fonction de reproduction masculine .....	222
9.2	Limites de nos travaux.....	222
9.2.1	Détection des nanoparticules.....	222
9.2.2	Conception des études cliniques.....	224
9.3	Conclusions.....	225

9.4 Perspectives.....	226
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
Résumé.....	237
Abstract .....	237

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : évolution de la qualité du sperme au XX <sup>e</sup> siècle. Source Swan SH. <i>et al.</i> 1997.....	22
Figure 2 : Variations géographiques des caractéristiques spermatiques en France. Bujan <i>et al.</i> .....	24
Figure 3 : Appareil reproducteur masculin. Source de l'image : <a href="http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical">http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical</a> .....	30
Figure 4 : Schéma d'une coupe sagittale de testicule. Source de l'image : <a href="http://bac-sc-rep.e-monsite.com">http://bac-sc-rep.e-monsite.com</a> .....	30
Figure 5 : Coupe histologique d'un tube séminifère observé en microscopie électronique après coloration au trichrome de Masson grossissement x 400. Source de l'image : <a href="http://colvibsvt.spaceblogs.net">http://colvibsvt.spaceblogs.net</a> .....	31
Figure 6 : Schéma d'une cellule de Sertoli entourée de cellules germinales à différents stades de maturation. SP : Spermatoocyte, Sp B : Spermatogonie de type B, M B : Membrane Basale. Source de l'image : <a href="http://fr.wikipedia.org">fr.wikipedia.org</a> .....	33
Figure 7 : Différentes parties du spermatozoïde en microscopie électronique. Pi : pièce intermédiaire, pp : pièce principale. ....	34
Figure 8 : Les différentes étapes de la spermatogenèse. SP : Spermatoocyte. Source de l'image : <a href="http://fr.wikipedia.org">fr.wikipedia.org</a> .....	36
Figure 9 : Axe hypothalamo-hypophysaire .....	39
Figure 10: Exemples de tests visant à évaluer la fragmentation de l'ADN spermatique. A. Test COMET : lyse des cellules puis migration du lysat sur un gel d'agarose. Après marquage de l'ADN par un agent fluorescent on observe un étalement de l'ADN sur le gel prenant l'aspect d'une comète, plus la queue de la comète est importante plus l'ADN est fragmenté (Source de l'image : <a href="http://ibidi.com">ibidi.com</a> ). B et C. Test TUNEL avec marquage fluorescent, les spermatozoïdes ayant un ADN fragmenté sont marqués en vert (Source de l'image : <a href="http://www.renoanniballo.it">www.renoanniballo.it</a> ). .....	42
Figure 11 : images en microscopie électronique à transmission montrant la biodistribution testiculaire des nanoparticules de silice de 70 nm. Les flèches indiquent la présence des particules dans les cellules de Sertoli et les spermatoocytes (A), à proximité des spermatozoïdes (B) et dans les noyaux des spermatoocytes (C). Souris contrôle (D). Sc : spermatoocyte, Se : cellule de Sertoli, Nb : nucléole. Morishita <i>et al.</i> .....	58
Figure 12 : Image de microscopie optique d'un testicule de souris exposé à 10 mg/kg/j de nanoparticules de dioxyde de titane, couplée à une analyse en spectroscopie Raman. Gao <i>et al.</i> <sup>62</sup> ..	60
Figure 13 : Schéma présentant un mécanisme possible d'inhibition de la prolifération d'une lignée de cellules souches spermatogoniales par les nanoparticules d'argent. Braydiche-Stolle <i>et al.</i> .....	64

Figure 14 : A. Coupes de testicules de souris exposées aux particules de noir de carbone observées en microscopie optique x 200 (a) Souris contrôle, (b) 14 nm faible dose, (c) 14 nm forte dose (0,1 mg/j sur 7j), (d) 56 nm forte dose, (e) 95 nm forte dose. Les flèches indiquent les zones de dégénérescence. B. pourcentage de tubes séminifères en dégénérescence, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 en comparaison du groupe contrôle. Yoshida *et al.* ..... 69

Figure 15 : Coupes de testicules de souris exposées aux nanotubes de carbone observées en microscopie optique. (a) et (b) souris contrôles ; (c) et (d) souris exposées à des injections répétées de nanotubes de carbone à J15 ; (e) idem à J60 ; (f) idem à J90. (g) pourcentage de tubes séminifères anormaux ; (h) épaisseur moyenne de l'épithélium germinatif ; (i) nombre moyen de spermatides par tube ; nombre moyen de spermatogonies par tube. Rouge : groupe contrôle, Jaune : nanotubes fonctionnalisés avec des groupements carboxyles, Vert : nanotubes fonctionnalisés avec des groupements amines, \* p < 0,05 par rapport au groupe contrôle. Bai *et al.*..... 70

Figure 16 : Coupes de testicules de souris exposées aux nanoparticules d'argent pendant 15 jours à la dose d'1 mg/kg/3j observées en microscopie optique à 15 jours, 60 jours et 120 jours après le début de l'exposition. Les flèches en E, K et Q indiquent les cellules germinales en apoptose. Garcia *et al.* 71

Figure 17 : Coupes de testicules de souris observées en microscopie optique. A à C : échelles : 50 µm ST : tubes séminifères Li *et al.* (A) Souris contrôles nées de mères non exposées ; (B) Souris nées de mères exposées au gaz diesel non filtré ; (C) Souris de mères exposées au gaz diesel filtré. D à G : Souris exposées à des nanoparticules de dioxyde de titane par voie orale pendant 90 j. Gao *et al.* Cercle bleu : raréfaction des spermatozoïdes, cercle jaune : raréfaction des cellules épithéliales, cercle vert : nécrose liée au déficit en testostérone, flèche bleu : congestion des espaces inter-tubulaires..... 72

Figure 18 : Coupes de testicules de rats observées en microscopie optique après exposition à des nanoparticules de silice de 15 à 20 nm. D'après les auteurs on observe en P : une image de congestion du testicule, en Q : un arrêt de la spermatogenèse en R : une image de nécrose testiculaire et en S : un œdème testiculaire. Hassankhani *et al.* ..... 73

Figure 19 : Evolution de la production annuelle d'aluminium, U.S. Geological Survey ..... 82

Figure 20 : répartition des emballages ménagers en aluminium en 2010 (Source : [www.france-alu-recyclage.com](http://www.france-alu-recyclage.com)) ..... 83

Figure 21 : images de microscopie optique montrant des testicules de souris non exposées (a : structure normale) ou exposés à 13 mg/kg de chlorure d'aluminium observées après 2 semaines (b : dommages modérés) ou après 5 semaines (c : importante perte cellulaire). Grossissement x264..... 91

Figure 22 : image de microscopie optique montrant une coupe de testicule de rat exposé à du chlorure d'aluminium par voie orale (34 mg/kg/j) pendant 70 jours. On note la présence de cellules



germinales exfoliées (E), d'une hyperplasie des cellules de Leydig (I), de vacuoles dans l'épithélium séminifère (V). Hématoxyline-éosine (x 400).....	92
Figure 23 : atome passant d'un état fondamental à un état excité par absorption d'un photon à longueur d'onde spécifique. Source de l'image du noyau : <a href="http://www.emilangues.education.fr">www.emilangues.education.fr</a> .....	94
Figure 24 : représentation schématique d'un appareillage d'un spectromètre d'absorption atomique. Sources : <a href="http://www.3bscientific.fr">www.3bscientific.fr</a> , <a href="http://www.clipart-gif.com">www.clipart-gif.com</a> , <a href="http://www.heraeus-noblelight.com">www.heraeus-noblelight.com</a> , <a href="http://www.voiron.net">www.voiron.net</a> , <a href="http://fr.freepik.com">fr.freepik.com</a> et <a href="http://www.francetop.net">www.francetop.net</a> .....	95
Figure 25 : schéma d'une torche à plasma. Source : <a href="http://didel.script.univ-paris-diderot.fr">didel.script.univ-paris-diderot.fr</a> .....	96
Figure 26 : atome passant d'un état excité à un état fondamental par émission d'un photon à longueur d'onde spécifique. Source de l'image du noyau : <a href="http://www.emilangues.education.fr">www.emilangues.education.fr</a> .....	97
Figure 27 : représentation schématique d'un appareillage de diffusion dynamique de la lumière. Sources des images : <a href="http://www.moteurnature.com">www.moteurnature.com</a> et <a href="http://www.francetop.net">www.francetop.net</a> .....	98
Figure 28 : illustration des variations d'intensité de signal obtenu en DLS au cours du temps en fonction de la taille des particules. L'intensité diffusée par des grosses particules (moins mobiles) varie moins vite que pour des petites particules. Source : <a href="http://fr.wikipedia.org">fr.wikipedia.org</a> .....	99
Figure 29 : en DLS, la courbe d'auto corrélation créée à partir des variations d'intensité du signal permet d'obtenir des informations sur le mouvement des particules et ainsi d'en déduire leur taille. ....	100
Figure 30 : schéma représentant les différentes émissions observables en MEB. ....	101
Figure 31 : image d'un plasma séminal en microscopie électronique à balayage. Les zones tangentielles au faisceau incident émettent un signal très intense. ....	102
Figure 32 : schéma d'un microscope électronique à balayage. Source : <a href="http://www.lrmh.fr">www.lrmh.fr</a> .....	103
Figure 33 : Schéma d'un microscope électronique à transmission. Source : <a href="http://www.ircelyon.univ-lyon1.fr">http://www.ircelyon.univ-lyon1.fr</a> .....	104
Figure 34 : signal recueilli lors du passage de 57 spermatozoïdes de patients en diffusion dynamique de la lumière. L'intensité du signal biologique s'avère particulièrement élevée. Kcps : kilocoups par seconde. ....	176
Figure 35 : images de microscopie électronique d'un plasma séminal, la détection de particules dans un environnement aussi riche en matériel biologique est presque impossible. A : illustration de la trame de fond des échantillons, x 2000. B : image d'un cristal sur trame de fond fissurée, x 800. ...	176
Figure 36 : Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules modèles utilisées pour les mises au point. A gauche : formule chimique des nanoparticules, au milieu : taille observée en diffusion dynamique de la lumière, à droite : particules observées en microscopie électronique à balayage.	177
Figure 37 : schéma présentant le protocole de séparation sur gradient de Percoll.....	179

Figure 38 : Signal observé en diffusion dynamique de la lumière exprimé en Kilocoups par seconde (kcps) pour les nanoparticules d'argent seules, le sperme seul et les nanoparticules d'argent et le sperme, avant et après gradient. ....	180
Figure 39 : Images des particules d'aluminium observées en microscopie électronique. A : particules isolées. B : particules en présence de sperme avant gradient. Le sperme masque totalement la présence des particules, l'aspect en feuille de fougère est lié à la cristallisation des électrolytes présents dans le plasma séminal. C : particules en présence de skperme après gradient. ....	180
Figure 40 : Mesure du point isoélectrique des particules de zinc, de titane et de fer. Au milieu : charge de surface (ou potentiel Z) en fonction du pH. Le point isoélectrique correspond au pH pour lequel les particules ont une charge de surface (ou potentiel Zeta) égale à 0. A droite, taille des particules en fonction du pH, les tailles les plus élevées correspondent à une agglomération maximale des particules. ....	182
Figure 41 : Signal observé en diffusion dynamique de la lumière exprimé en Kilocoups par seconde (kcps) pour les nanoparticules de fer seules, le sperme seul et les nanoparticules de fer et le sperme, avant et après reprise dans le tampon (NaCl 0,9% à pH 10) puis gradient. ....	183
Figure 42 : Mesure du seuil de détection des particules en diffusion dynamique de la lumière. Pour chaque particule, le signal en Kilocoups par seconde (kcps) et la taille des particules est donné en fonction de la concentration en particules. ....	184
Figure 43 : Images de testicules observés en microscopie confocale ou à épifluorescence issus des études de Kwon <i>et al.</i> et de Klein <i>et al.</i> A : Testicule de souris contrôle (Kwon <i>et al.</i> ) B-C : Testicules de souris exposées aux nanoparticules fluorescentes (Kwon <i>et al.</i> ) D-E-F : Testicules de souris contrôles (Klein <i>et al.</i> ) 1 : tube séminifère. 2 : espace inter-tubulaire. ....	218
Figure 44 : A. Coupe d'un testicule de souris exposée à des nanoparticules fluorescentes observée en microscopie confocale Kim <i>et al.</i> <sup>59</sup> B. Coupe d'un testicule de souris contrôle observée en microscopie à épifluorescence Klein <i>et al.</i> <sup>159</sup> 1. Tube séminifère. 2. Espace intertubulaire. ....	219
Figure 45 : schéma résumant les limites des études cliniques que nous avons réalisées. ....	224

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Aperçu des études rétrospectives sur la qualité du sperme publiées depuis 1995 dans le monde : lieux, périodes d'étude, populations étudiées, facteurs d'ajustement, résultats principaux. Bujan <i>et al.</i> .....	25
Tableau 2 : Principales études sur les variations géographiques de la production et/ou de la qualité spermatique publiées depuis 1995 dans le monde. Bujan <i>et al.</i> .....	26
Tableau 3 : Etudes sur la biodistribution testiculaire des nanoparticules. NP : NanoParticules, NFS : Numération Formule Sanguine, ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, SAA : Spectrométrie d'Absorption Atomique, MET : Microscopie Electronique à Transmission, BHT : Barrière Hémato-Testiculaire, FITC : Isothiocyanate de fluorescéine, ED-XRF : energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy.....	53
Tableau 4 : Résultats des analyses de sperme retrouvés dans l'étude de Gao et al. après exposition de souris à des nanoparticules de dioxyde de titane. <sup>62</sup> .....	60
Tableau 5 : Etudes sur la biopersistence testiculaire des nanoparticules.....	61
Tableau 6 : Résumé des études ayant exploré l'impact des nanoparticules sur les paramètres spermatiques. = pas de différence significative par rapport au contrôle. + augmentation significative par rapport au contrôle. – diminution significative par rapport au contrôle. NR : non réalisé. DSP (Daily Sperm Production) : production journalière de spermatozoïdes. ....	75
Tableau 7 : Estimation de l'exposition des populations à l'aluminium <sup>101</sup> . * valeur moyenne de référence retenue pour des estimations globales. ....	86
Tableau 8 : tableaux issus de divers articles écrits par une équipe égyptienne et montrant l'impact de l'aluminium et de divers facteurs protecteurs sur les paramètres spermatiques. Il faut noter que dans chaque étude l'ensemble des paramètres étudiés est altéré par la présence d'aluminium.....	90

## **GLOSSAIRE DES ABRÉVIATIONS**

3 $\beta$ HSD1 : Steroid Delta-Isomerase 1

17 $\beta$ -HSD : 17 Beta HydroxySteroid Dehydrogenase

ABP : Androgen Binding Protein

ADAM3 : A Disintegrin And Metalloprotease 3

ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments et des Produits de Santé

Al : Aluminium

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ANSM : Agence National de Sécurité du Médicament

ARNm : Acide RiboNucléique messenger.

ATP : Adenosine TriPhosphate

BHT : Barrière Hémato-Testiculaire

CECOS : Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CIRC : Centre International de Recherche contre le Cancer

COMET : single-cell electrophoresis assay

Cyp11a1 : Cytochrome P450, Family 11, Subfamily A

Cyp2E1 : Cytochrome P450, Family 2, SubfamilyE, Polypeptide 1

DSP: Daily Sperm Production

DHT : DiHydroTestostérone

EFSA : European Food Safety Authority

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FDA : Food and Drug Administration

FSH : Follicle Stimulating Hormon

GDNF : Glial cell line-Derived Neurotophic Factor

GFR $\alpha$ -1 : GDNF family receptor alpha-1

GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormone

HSD3B1 : Hydroxy-Delta-5-Steroïd Dehydrogenase, 3 Beta

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

IGF1 : Insulin like Growth Factor 1

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

InVS : Institut de Veille Sanitaire

LDH : Lactate DésHydrogénase

LH : Luteinizing Hormone

Ly6e : Lymphocyte Antigen 6 Complexe, Locus E

LINA : Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées

MDA : malondialdehyde

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MVD : Mevalonate (Diphospho) Decarboxylase

MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

NFS : Numération Formule Sanguine

NIOSH : National Institute for Occupational Safety and Health

NP : NanoParticules

Nrbp2 : Nuclear receptor binding protein 2

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P450scc: cholesterol Side-Chain Cleavage enzyme

Prm1 : Protamine 1

Sc4mol : Sterol-C4-Methyl Oxidase-Like

SCD: Sperm Chromatin Dispersion

SCSA :Sperm Chromatin Structure Assay

SAA : Spectrométrie d'Absorption Atomique

Spata 19 : Spermatogenesis Associated 19

SP ICP-MS : Single Particle ICP-MS

Srd5a2 : Steroid 5 –Alpha-Reductase 2

StAR : protéine régulatrice de la stéroïdogénèse

ROS : Radical Oxygen Species

Tdrd6 : Tudor Domain Containing 6

TiO2 : dioxyde de titane

Tnp2 : Transition Protamine 2

TUNEL: deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling assay

---

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1 INTRODUCTION

Ce travail a été effectué dans le cadre du Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées (LINA). Cette équipe de recherche a été labellisée en 2011 au sein de l'université Jean-Monnet et de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne. Elle s'organise autour de trois axes de recherche principaux : l'évaluation de la biodistribution, de la biopersistence et de la biotoxicité des nanoparticules aérosolisées.

Le premier axe qui s'intéresse à la biodistribution des nanoparticules aérosolisées a pour objectif de :

- Définir expérimentalement le champ des cibles anatomiques et cellulaires pouvant être atteintes en fonction des caractéristiques physiques des nano-aérosols.
- Développer des solutions technologiques pour proposer des systèmes d'administration d'aérosols de nanoparticules, liquides ou solides, fluorescentes ou radiomarquées pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques.
  - Application à l'aérosolthérapie nanométrique, scintigraphie de ventilation en médecine nucléaire.
  - Application à l'identification des cibles (toxicologiques/thérapeutiques) des nano-aérosols, *in vitro* sur des modèles anatomiques humains plastinés et *in vivo* sur un modèle de primates.

Le deuxième axe traitant de la biopersistence des nanoparticules aérosolisées a pour objectif d'évaluer le devenir cellulaire et tissulaire des nanoparticules au travers :

- De la synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules à façon.
- Du suivi de ces nanoparticules par observations microscopiques multimodales.
- De la quantification de la charge nanoparticulaire dans les tissus (prélèvements humains *ex vivo*, modèles animaux).

Le troisième axe qui s'intéresse aux interactions nanoparticules-cellules et à la biotoxicité des nanoparticules aérosolisées nécessite :

- La caractérisation physico-chimique des nanoparticules et l'analyse de leurs effets biologiques *in vitro*.
- La caractérisation granulométrique et l'analyse chimique (impuretés, chimie de surface, cristallinité...) des nanoparticules.



- La mesure des effets cellulaires des nanoparticules (action pro-inflammatoire, perte d'intégrité membranaire, stress oxydant, génotoxicité, etc.).
- Le développement de nanoparticules fluorescentes avec et sans fonctionnalisation.

La pluridisciplinarité de l'équipe permet d'associer des biologistes et des médecins pour la mise en place des modèles, la collecte des échantillons et, le cas échéant, le recueil des données cliniques, et des ingénieurs et des physico-chimistes pour le développement de nanoparticules modèles et leur caractérisation dans les milieux biologiques.

Dans les travaux qui vont vous être présentés, nous nous sommes intéressés à l'impact des nanoparticules et de l'aluminium (sous forme particulaire ou soluble) sur la fonction de reproduction masculine en nous inscrivant dans les trois axes de recherche du LINA. De ce fait, deux grands groupes d'études ont été réalisés :

- Un groupe s'intéressant à la biodistribution des nanoparticules au sein du testicule au travers d'études animales.
- Un groupe s'intéressant à la biopersistance et à la biotoxicité des nanoparticules et de l'aluminium sur la fonction de reproduction masculine au travers d'étude cliniques menées dont les sujets ont été recrutés dans le service d'histologie-embryologie de l'Hôpital Nord du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Saint-Etienne.

Ce document est divisé en deux parties distinctes : une partie bibliographique qui vise à remettre le travail effectué dans son contexte scientifique et une partie expérimentale. La partie bibliographique est elle-même divisée en cinq chapitres :

- Le premier chapitre s'intéresse à l'évolution de la fertilité masculine en France et dans le monde.
- Le deuxième chapitre expose quelques pré-requis concernant la reproduction humaine et l'histologie d'appareil génital masculin, indispensables à une bonne compréhension du travail.
- Le troisième chapitre reprend des notions de base concernant la physico-chimie des nanoparticules et fait une revue de la littérature la plus complète et détaillée possible sur leur impact potentiel sur la fonction de reproduction masculine.

- Le quatrième chapitre parle de l'exposition à l'aluminium, de ses effets sur la santé humaine et de son impact potentiel sur la fonction de reproduction masculine.
- Le cinquième chapitre traite des techniques de détection des éléments chimiques et des nanoparticules dans les milieux biologiques. Par l'intermédiaire d'une revue, il décrit également les procédés qui ont été employés jusqu'à maintenant pour rechercher des nanoparticules dans les liquides et les tissus humains, et met en évidence leurs principales limites.

La partie expérimentale a, quant à elle, été divisée en deux chapitres qui reprennent d'une part les travaux réalisés sur modèles animaux et d'autre part les études cliniques

L'ensemble du travail est enfin discuté dans une dernière partie et les études envisagées pour le poursuivre y sont évoquées.

## 2 EVOLUTION DE LA FERTILITE MASCULINE

### 2.1 LA FERTILITE MASCULINE BAISSÉ-T-ELLE VRAIMENT ?

Le Figaro le 11/12/2012 : « La fertilité masculine baisse-t-elle vraiment ? »<sup>1</sup>, Le monde le 05/12/2012 : « Fertilité masculine : les dangers avérés des perturbateurs endocriniens »<sup>2</sup>, France 24 le 05/12/2012 : « Le spermatozoïde français, une espèce en voie de disparition ? »<sup>3</sup>. Dans les médias grands publics, les gros titres sur la diminution de la fertilité en France et dans le monde, et particulièrement sur la baisse de la fertilité masculine se succèdent à un rythme soutenu ces dernières années. Si les médias ont tendance à jouer sur les peurs pour accroître leurs ventes, la question n'est toutefois pas sans fondement scientifique.

Comme nous l'avons montré précédemment, il est relativement difficile d'évaluer la fertilité masculine en tant que telle puisque cela nécessiterait de s'affranchir des troubles de la fertilité qui sont totalement ou partiellement liés aux femmes. C'est pourquoi la majorité des études s'est concentrée sur l'analyse des paramètres spermatiques qui reflètent, certes de façon imparfaite, les capacités de reproduction des hommes. Ainsi, au début des années 1990, la parution d'un article de Carlsen *et al.* a suscité un vif débat dans la communauté scientifique. Celui-ci montrait l'existence d'une diminution du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat entre 1938 et 1990, à travers des études réalisées principalement aux États-Unis<sup>4</sup>. En 1997, Swan *et al.* reprend les résultats de la revue de Carlsen *et al.*, élargit son champ d'investigation à un plus grand nombre de pays<sup>5</sup> et arrive à des conclusions similaires (Figure 1), à savoir une diminution du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat évalué à 1% par an sur les cinquante dernières années. L'implication de toxiques environnementaux qui seraient responsables de cette évolution est fortement suspectée. Il faut noter toutefois que les quelques études réalisées dans les pays en voie de développement ne retrouvent pas cette tendance.

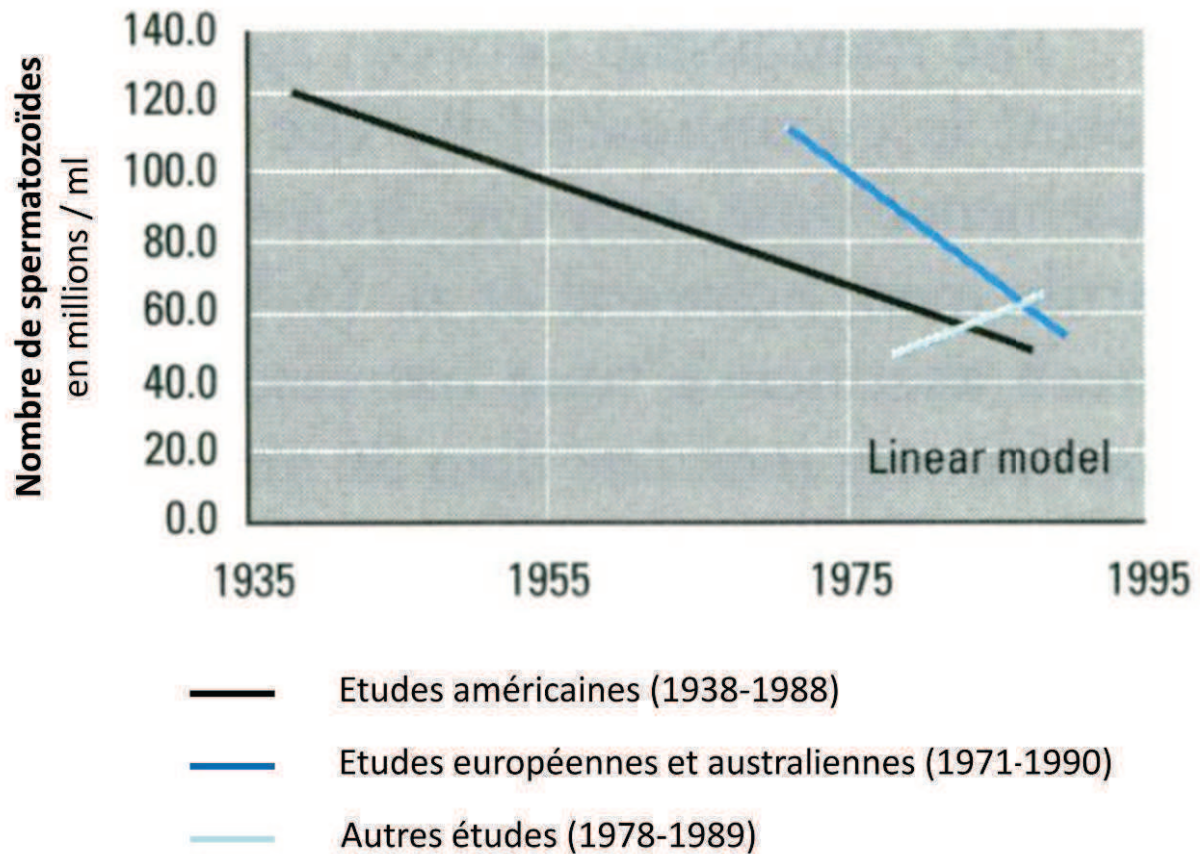


FIGURE 1 : EVOLUTION DE LA QUALITE DU SPERME AU XX<sup>E</sup> SIECLE. SOURCE SWAN SH. ET AL. 1997.

Parallèlement à ces conclusions, il a été noté une diminution similaire des paramètres spermatiques dans un certain nombre d'espèces animales sauvages, elles aussi exposées à divers toxiques environnementaux. C'est par exemple le cas de la panthère de Floride dont les mâles présentent une augmentation de la fréquence des cryptorchidies\* et une altération des caractéristiques spermatiques. Les auteurs ont établi un lien entre ces anomalies et l'exposition aux pesticides et au mercure<sup>6</sup>. Dans une étude menée sur les alligators du lac Apopka en Floride, il est constaté une diminution de la taille du pénis et de la concentration plasmatique en testostérone des mâles que les auteurs ont attribué à une exposition aux pesticides<sup>7</sup>. Des anomalies du tractus génital masculin sont

\* Cryptorchidie : elle correspond à l'absence d'un ou des deux testicules dans le scrotum. La présence d'une cryptorchidie augmente le risque d'infertilité par altération de la spermatogenèse et le risque de cancer du testicule. Une prise en charge chirurgicale précoce permet d'atténuer ces risques.

également en recrudescence chez l'homme, c'est en particulier le cas de la cryptorchidie et de l'hypospadias<sup>†</sup> ainsi que du cancer du testicule<sup>9</sup>. Skakkebaek *et al.* ont évoqué l'existence d'un lien entre toutes ces anomalies et proposé la dénomination d'un nouveau syndrome baptisé : « syndrome de dysgénésie gonadique » dont l'origine serait environnementale. Toutes ces constatations étayent l'hypothèse d'une évolution possible vers l'altération des capacités de reproduction des hommes à long terme.

## 2.2 LA SITUATION EN FRANCE

L'évolution des paramètres spermatiques en France a été étudiée au travers de plusieurs travaux menés sur les registres des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme (CECOS). Ces registres ont en effet l'avantage de répertorier les caractéristiques spermatiques d'une population d'hommes relativement homogène au cours du temps (entre 18 et 45 ans, ayant déjà fait la preuve de leur fertilité).

Une première étude a ainsi été réalisée à Paris-Bicêtre sur 1351 donneurs entre 1973 et 1992<sup>10</sup>. Elle concluait à une diminution du nombre de spermatozoïdes (de 89 à 60 M/ml), de leur mobilité et du nombre de formes normales. A âge et délai d'abstinence égaux, les hommes nés les plus récemment présentaient une concentration en spermatozoïde plus faible.

Une seconde étude, réalisée avec la même méthodologie que celle de Paris-Bicêtre, entre 1977 et 1992, sur le CECOS de Toulouse et regroupant 302 hommes, a fourni des résultats diamétralement opposés<sup>11</sup>. En effet, aucune variation du nombre, de la mobilité ou de la morphologie des spermatozoïdes n'a été constatée sur cette période. Toutefois la concentration spermatique observée à Toulouse était plus faible qu'à Paris ( $83,1 \pm 68,4 \times 10^6$ /ml contre  $98,8 \pm 73,5 \times 10^6$ /ml).

Enfin, une dernière étude réalisée au CECOS de Tours entre 1976 et 2009 a mis en évidence une diminution du nombre de spermatozoïdes par éjaculat (443,2 à 300,2 millions) accompagnée d'une baisse de leur mobilité (64% à 44%) et de leur vitalité (88% à 80%)<sup>12</sup>.

---

<sup>†</sup> Hypospadias : malformation des voies génitales masculines se traduisant par une ouverture de l'urètre à la face inférieure du pénis.

La variabilité des résultats obtenus sur ces trois études incite à penser qu'il existe des différences régionales en ce qui concerne les caractéristiques spermatisques des hommes. Ainsi une étude rétrospective réalisée sur 8 CECOS et sur 4710 hommes féconds a montré l'existence de variations significatives entre les régions étudiées concernant le volume de l'éjaculat ( $3,2 \pm 1,7$  ml à  $4,3 \pm 1,8$  ml), le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat ( $259 \pm 183 \times 10^6$  à  $398 \pm 376 \times 10^6$ ) et leur mobilité ( $59 \pm 15\%$  à  $69 \pm 12\%$ ), l'ensemble des analyses tenant compte de l'âge et du délai d'abstinence<sup>13</sup>. Ces résultats sont résumés sur la Figure 2.

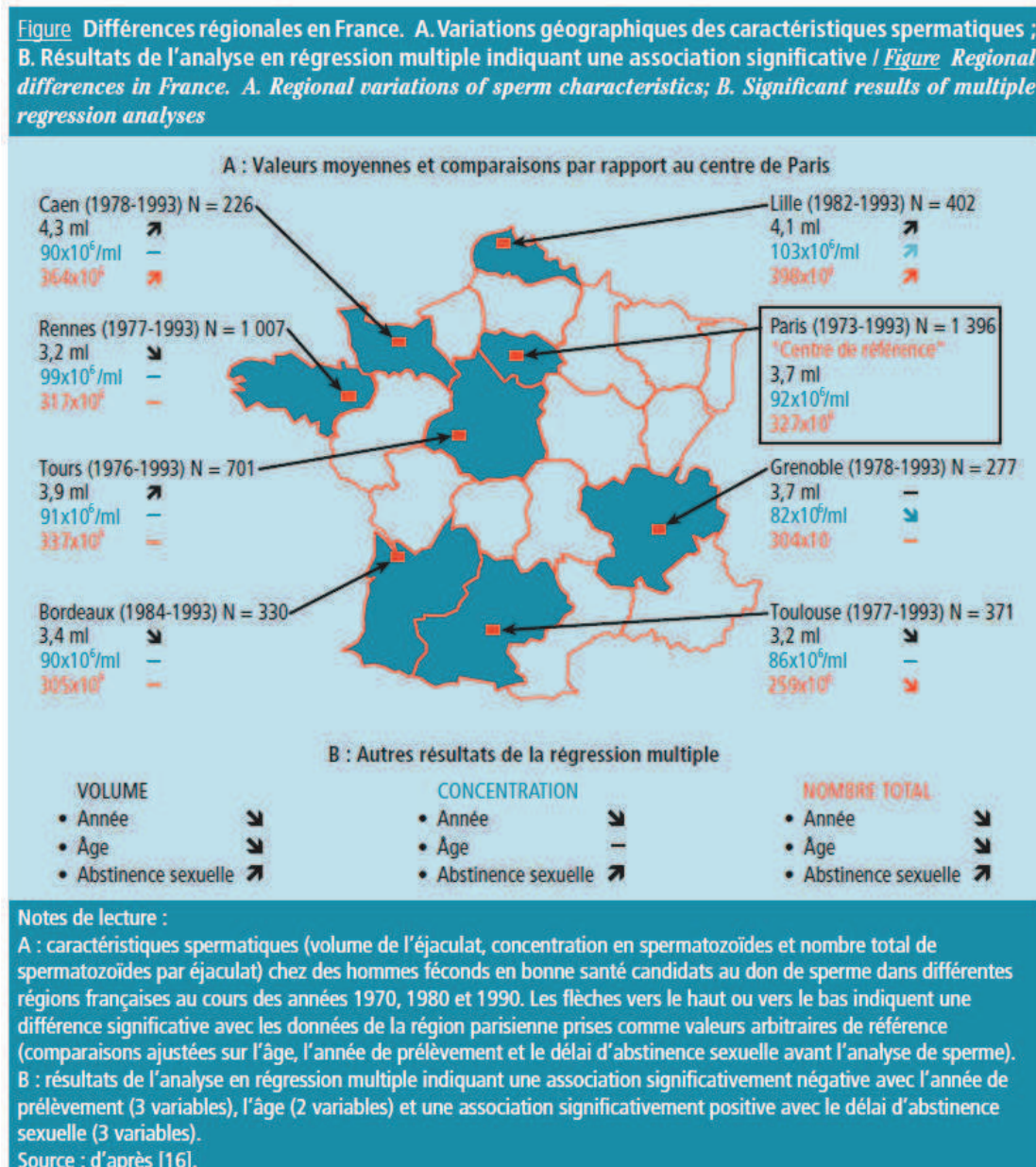


FIGURE 2 : VARIATIONS GEOGRAPHIQUES DES CARACTERISTIQUES SPERMATIQUES EN FRANCE. BUJAN ET AL.



## 2.3 LA SITUATION DANS LE MONDE

En 2012 l'InVS (Institut de Veille Sanitaire) a recensé l'ensemble des études réalisées sur le sujet à travers le monde. Elle sont récapitulées dans le Tableau 1<sup>14</sup>. Malgré les différences dans le type de populations recrutées, la taille des échantillons, les périodes d'études, la prise en compte de facteurs confondants, une bonne moitié des travaux concluent à une diminution de la concentration spermatique dans l'éjaculat.

**Tableau 1** Aperçu des études rétrospectives sur la qualité du sperme publiées depuis 1995 dans le monde : lieux, périodes d'étude, populations étudiées, facteurs d'ajustement, résultats principaux / **Table 1** Retrospective studies published on sperm characteristics worldwide since 1995: locations, study periods, populations, adjustment factors, and main results

Étude	Lieu	Période	Nombre d'hommes (nombre moyen/an)	Type de population*	Prise en compte des covariables âge, délai d'abstinence <sup>1</sup>	Concentration spermatozoïdes <sup>2</sup>	Autres caractéristiques <sup>3</sup>
<b>Années 1960/1970</b>							
Auger et coll., 1995 [13]	Paris (France)	1973-1992	1 351 (68)	CDSNS, pères	2	↓ <sup>4</sup>	NS vol ↓ mob ↓ morph
Bujan et coll., 1996 [14]	Toulouse (France)	1977-1992	302 (19)	CDSNS, pères	2	NS	ND
Andolz et coll., 1999 [57]	Barcelone (Espagne)	1960-1996	22 759 (615)	INF	2	NS	↓ vol ↑ mob ↓ morph
Vierula et coll., 1996 [58]	Turku (Finlande)	1967-1994	5 481 (196)	SFI et INF	2	NS	↓ vol
Menchini Fabris et coll., 1996 [59]	Pise (Italie)	1970-1990	4 518 (215)	INF	0	↓	ND
Adamopoulos et coll., 1996 [60]	Athènes <sup>5</sup> (Grèce)	1977-1993	2 385 (88)	INF	1	↓ <sup>10</sup>	ND
Van Waelegem et coll., 1996 [61]	Gand (Belgique)	1977-1995	416 (22)	CDSNS, SFI	0	↓	NS vol ↓ mob ↓ morph
Nieschlag et Lerch, 1996 [62]	Münster (Allemagne)	1977-1993	187 (11)	DR	0	NS	ND
Gyllenberg et coll., 1999 [63]	Copenhague (Danemark)	1977-1995	1 927 (101)	CDSNS, SFI	1	↑	↓ mob
Fisch et coll., 1996 [64]	Minnesota (États-Unis)	1970-1994	662 (26)	PREV, pères et SFI	2	↑	NS vol NS mob
Fisch et coll., 1996 [64]	New York (États-Unis)	1972-1994	400 (17)	PREV, pères et SFI	2	↑	NS vol NS mob
Fisch et coll., 1996 [64]	Los Angeles (États-Unis)	1978-1994	221 (13)	PREV, SFI	2	↑	NS vol NS mob
Paulsen et coll., 1996 [65]	Seattle (États-Unis)	1972-1993	510 (23)	DR	0	NS	NS vol NS morph
Itoh et coll., 2001 [66]	Sapporo (Japon) <sup>6</sup>	1975-1998	711 (30)	SFI et pères	0	NS	NS vol
Zheng et coll., 1997 [67]	Danemark	1968-1992	8 608 (344)	INF	2	↓ <sup>4</sup>	NS vol ↓ morph
Splingart et coll., 2012 [15]	Tours (France)	1976-2009	1 114	CDSNS, pères	0	↓	↓ mob, morph
<b>Années 1980</b>							
De Mouzon et coll., 1996 [68]	France <sup>7</sup>	1989-1994	7 714 (482)	PFOT	0	↓	ND
Zorn et coll., 1999 [69]	Ljubljana (Slovénie)	1983-1996	2 343 (167)	PFOT	2	NS	↓ mob
Irvine et coll., 1996 [70]	Édimbourg (Royaume-Uni)	1984-1995	577 (48)	DR, pères et SFI	0	↓ <sup>4</sup>	ND
Berling et Wolner-Hanssen, 1997 [71]	Suède (sud)	1985-1995	718 (65)	INF	1	↑	↓ vol ↑ mob ↑ morph
Lackner et coll., 2005 [72]	Vienne (Autriche)	1986-2003	7 780 (432)	INF	0	↓	NS mob NS morph
Benshushan et coll., 1997 [73]	Jérusalem (Israël)	1980-1995	188 (12)	CDSNS, SFI	0	NS	↑ vol ↓ mob
Younglai et coll., 1998 [74]	Canada <sup>8</sup>	1984-1996	48 968 (3766)	INF	0	↓	ND
Handelsman 1997 [75]	Sydney (Australie)	1980-1995	509 (32)	CDSNS, pères	0	NS	ND
Seo et coll., 2000 [76]	Corée	1989-1998	22 249 (2 225)	INF	0	NS	NS vol NS mob
<b>Années 1990</b>							
Rasmussen et coll., 1997 [77]	Odense (Danemark)	1990-1996	1 055 (151)	PFOT	0	NS	NS vol
Sripada et coll., 2007 [78]	Écosse (nord) (RU)	1994-2005	4 832 (403)	INF <sup>9</sup>	2	↓	NS mob
Almagor et coll., 2003 [79]	Jérusalem (Israël)	1990-2000	2 638 (240)	INF	0	↓	↓ mob
Adiga et coll., 2008 [80]	(Inde)	1993-2005	7 770	INF	0	↓	↓ mob, morph
Shine et coll., 2008 [81]	(Nouvelle-Zélande)	1987-2007	975	CDSNS	2	↓	↓ vol
Feki et coll., 2009 [82]	Sfax (Tunisie)	1996-2007	2 940 (245)	INF	2	↓	NS mob ↓ morph
Jorgensen et coll., 2011 [83]	(Finlande)	1998-2006	856	SFI	2	↓	↓ morph
Axelsson et coll., 2011 [84]	(Suède)	2000-2001	216	SFI	2	NS	NS
		2008-2010	295				

\* CDSNS : candidats au don de spermatozoïdes non sélectionnés ; SFI : statut de fertilité inconnu ; INF : infécond ; DR : donneur de sperme pour la recherche ; PREV : pré-vasectomie ; PFOT : partenaires de femmes avec obstruction tubaire.  
<sup>1</sup> 0=aucun ajustement ; 1=ajustement sur l'âge ou le délai d'abstinence ; 2=ajustement sur l'âge et le délai d'abstinence. † ↓ diminution significative ; † augmentation significative ; NS : pas de différence significative. † vol : volume de l'éjaculat ; mob : pourcentage de spermatozoïdes progressifs ; morph : pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux. † Baisse avec année naissance plus récente. † Nombre total de spermatozoïdes mesuré dans 3 laboratoires différents à Athènes. † Comparaisons des deux périodes 1975-1980 vs 1998. † Résultats de 77 centres. † Résultats de 11 centres d'exploitation des infertilités du couple. † Sélection des hommes ayant plus de 20 millions/ml spermatozoïdes. † Nombre total de spermatozoïdes par éjaculat.  
Source : d'après [8].

**TABEAU 1 : APERÇU DES ETUDES RETROSPECTIVES SUR LA QUALITE DU SPERME PUBLIEES DEPUIS 1995 DANS LE MONDE : LIEUX, PERIODES D'ETUDE, POPULATIONS ETUDIEES, FACTEURS D'AJUSTEMENT, RESULTATS PRINCIPAUX. BUJAN ET AL.**

Concernant les variations interrégionales, la première étude réalisée sur le sujet l'a été sur quatre villes européennes : Turku (Finlande), Copenhague (Danemark), Édimbourg (Royaume-Uni) et Paris<sup>15</sup>. Malgré une harmonisation des méthodes d'analyse, elle montrait des différences à la fois sur le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat et sur leur mobilité. D'autres études du même type ont

été réalisées par la suite dont les conclusions sont regroupées dans le Tableau 2. Dans l'ensemble l'existence de variations interrégionales sur plusieurs paramètres spermatiques est confirmée. Toutefois, en dépit de questionnaires très précis, aucune association avec de possibles facteurs environnementaux n'est avérée.

**Tableau 2** Principales études sur les variations géographiques de la production et/ou de la qualité spermatique publiées depuis 1995 dans le monde : lieux, périodes d'étude, populations étudiées, facteurs d'ajustement, résultats / **Table 2** Main studies published worldwide since 1995 on geographical variations in sperm characteristic: locations, study periods, population, adjustment factors, and results

Étude / Lieu	Période	Type d'étude	Type de population*	Prise en compte des covariables âge, délai d'abstinence	Différences <sup>1</sup>
Auger et Jouannet, 1997 [16] France Lille/Rennes/Caen/Paris/Bordeaux/Grenoble/Toulouse	1973-1992	Rétrospective	CDSNS, pères N=4 710	Oui	=vol =con =mob
Fisch et coll., 1996 États-Unis [85] Californie/Minnesota/New York	1972-1994	Rétrospective	CDSNS, PREV, SFI N=400	Non	=con
Jorgensen et coll., 2001 [17] Europe Édimbourg/Turku/Copenhague/Paris	1977-1992	Transversale	PFE N=1 082	Oui	ND
Iwamoto et coll., 2006 [86] Japon (Kawasaki/ Yokohama) vs. Europe (étude précédente)	1998	Transversale	PFE N=324	Oui	=con =ntot =mob =morph
Swan et coll., 2003 [87] États-Unis Missouri/Minnesota/New York/Californie	1999-2001	Transversale	PFE N=512	Oui	
Jorgensen et coll., 2002 [88] Danemark/Norvège/Finlande/Estonie	1997-2000	Transversale	C, HPG N=968	Oui	=con =ntot (gradient est-ouest)
Punab et coll., 2002 [89] Lituanie/Estonie vs. étude précédente	1997-1999	Transversale	C, HPG N=393	Oui	=con =ntot con et ntot > valeurs dans l'étude précédente
Tsarev et coll., 2005 [90] Lettonie vs. études précédentes	2004	Transversale	C N=133	Non	=con études précédentes sauf vs Danemark
Dhooge et coll., 2007 [91] Flandres Anvers (ville), Peer (campagne)	1970-1990	Transversale	HPG, SFV N=100	Non	=vol =con =ntot =morph
Paasch et coll., 2008 [92] Allemagne Hambourg/Liepzig	2003-2005	Transversale	C, SFI N=811	Non	=con =mob =morph

\* CDSNS : candidats au don de spermatozoïdes non sélectionnés ; PREV : pré-vasectomie ; PFE : volontaires, partenaires de femme enceinte ; C : conscrits ; HPG : hommes volontaires de la population générale 20-40 tirés au sort contactés par courrier ; SFV : statut de fertilité variable ; SFI : statut de fertilité inconnu.  
<sup>1</sup> Variations régionales : = pour « absence » ; ≠ pour « présence », vol : volume de l'éjaculat ; con : concentration de spermatozoïdes 10<sup>6</sup>/ml ; mob : pourcentage de spermatozoïdes progressifs ; morph : pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux ; ntot : numération totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat.  
 Source : d'après [8].

TABLEAU 2 : PRINCIPALES ETUDES SUR LES VARIATIONS GEOGRAPHIQUES DE LA PRODUCTION ET/OU DE LA QUALITE SPERMATIQUE PUBLIEES DEPUIS 1995 DANS LE MONDE. BUJAN ET AL.

## 2.4 LES CAUSES D'UNE DIMINUTION DE LA FERTILITE MASCULINE

Malgré l'existence possible de certains biais : biais de sélection, taux de participation, biais concernant les méthodes d'analyse du sperme, il semble exister des variations temporelles et



géographiques des paramètres spermatiques. Ceci amène à s'interroger sur l'impact d'éventuels facteurs environnementaux.

Ainsi de nombreux facteurs environnementaux ont montré qu'ils pouvaient être à l'origine d'une diminution de la fertilité masculine. Certains d'entre eux présentent une toxicité directe sur la spermatogenèse, c'est entre autres le cas du tabac<sup>16</sup> et particulièrement de l'exposition intra-utérine au tabac<sup>17,18</sup>, de quelques métaux lourds tels que le mercure ou le plomb<sup>19</sup>, de la chaleur<sup>20</sup> ou de certains traitements médicaux tels que les radiations ionisantes ou les chimiothérapies utilisées en cancérologie. D'autres en revanche, agissent en altérant le fonctionnement du système endocrinien, on appelle alors ces facteurs des perturbateurs endocriniens. Les plus connus sont les polluants organiques persistants (dioxines, furanes,...), les constituants des plastiques (bisphénol A, phtalates,...), les pesticides<sup>21,22</sup> (dibromochloro-propane, chlordécone,...) ou les phyto-oestrogènes (comme les isoflavones contenus dans les préparations à base de soja)<sup>23-25</sup>.

#### **2.4.1 RISQUES ET PROBLEMES POSES PAR LES EXPOSITIONS MULTIPLES**

L'une des difficultés de l'évaluation de l'impact des facteurs environnementaux sur les caractéristiques spermatiques est qu'il s'agit souvent d'une exposition multiple à de faibles quantités de toxiques. De ce fait, les études montrent que le plus souvent, une exposition faible à un facteur unique ne va pas avoir d'importantes répercussions sur la spermatogenèse. En revanche, l'association de ces facteurs peut avoir un caractère délétère synergique<sup>26</sup>.

R. Salma illustre bien ces difficultés d'interprétation dans une l'une de ces études par une démonstration assez simple<sup>27</sup>. Si l'on prend un facteur théorique auquel aucune femme enceinte n'était exposée en 1920 mais auquel 40 % des femmes enceintes étaient exposées en 1970, si l'on suppose que l'exposition intra-utérine à ce facteur entraîne une diminution du nombre de spermatozoïdes de 20 % à l'âge adulte, si en 1950 la concentration en spermatozoïdes dans le sperme était de 100 millions par ml chez les hommes de 30 ans, alors la prise en compte de ce seul facteur d'exposition entrainera une diminution de cette moyenne de seulement 8 millions par ml la faisant passer à 92 millions par ml en 2000 (Ce chiffre est obtenu par le calcul suivant :  $100 \times 0,6 + (100 - 0,2 \times 100) \times 0,4$ ). Sur un échantillon de petite taille une telle diminution peut ne pas être significative malgré l'impact important de ce facteur. Ces chiffres ne sont pas choisis au hasard et correspondent à peu près à l'évolution de l'exposition des femmes enceintes au tabac et à ses effets sur la spermatogenèse. Ainsi une diminution aussi substantielle de la spermatogenèse que celle observée dans la revue de Swan *et al.* ne peut être expliquée que par l'association de plusieurs facteurs ayant un effet simultané voire synergique.

Une autre difficulté est l'apparition ininterrompue de nouvelles expositions potentiellement toxiques pour la reproduction humaine. Pour chacune de ces nouvelles expositions, l'impact potentiel sur la fertilité masculine devrait être étudié ce qui nécessite un véritable investissement en temps et en moyens financiers.

Ainsi l'objectif de cette thèse a été d'évaluer l'impact potentiel de deux facteurs environnementaux auxquels les hommes sont potentiellement de plus en plus exposés : les nanomatériaux et l'aluminium sous forme particulaire ou non. Pour ce faire deux grands types de travaux complémentaires ont été menés : des travaux visant à évaluer la biodistribution testiculaire des éléments particuliers sur modèle murin et des études cliniques transversales recherchant un lien entre la présence des particules ou de l'aluminium dans le sperme humain et l'altération des caractéristiques spermatiques.

### 3 LA FONCTION DE REPRODUCTION MASCULINE

Afin de bien comprendre les travaux qui vont suivre des connaissances de base sur la fonction de reproduction masculine sont nécessaires. L'objectif n'est en aucun cas de faire une description exhaustive de toutes les connaissances sur cette fonction, ses altérations possibles et les moyens de l'évaluer mais de permettre au lecteur de comprendre la démarche scientifique et les résultats présentés dans ce travail.

#### 3.1 ORGANISATION MORPHOLOGIQUE ET FONCTIONNELLE DE L'APPAREIL

##### REPRODUCTEUR MASCULIN

L'appareil reproducteur masculin comprend les testicules, responsables de la production des spermatozoïdes et de la synthèse d'androgènes ; les voies génitales excrétrices constituées de l'épididyme, des canaux déférents, du canal éjaculateur et de la portion terminale de l'urètre ; les glandes annexes avec la prostate, les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétrales ; et enfin le pénis<sup>28</sup> (Figure 3).

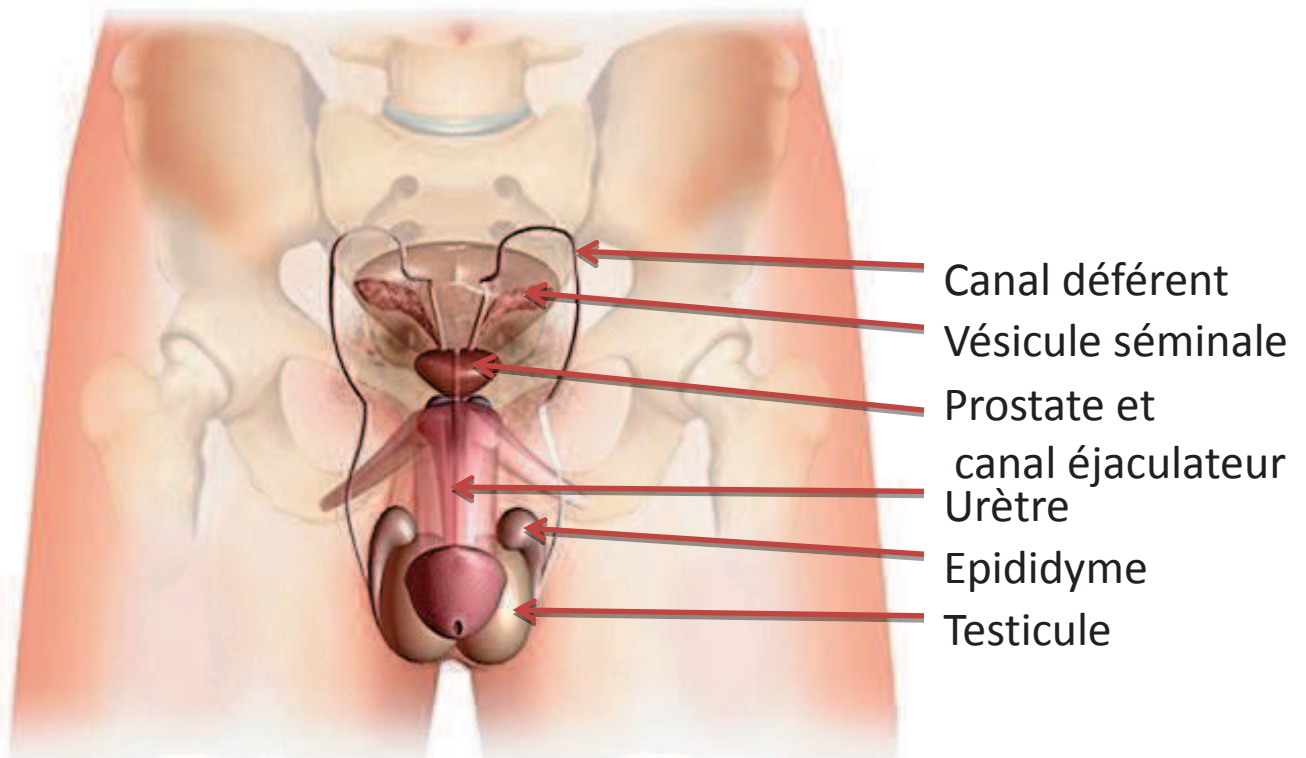


FIGURE 3 : APPAREIL REPRODUCTEUR MASCULIN. SOURCE DE L'IMAGE : [HTTP://WWW.LAROUSSE.FR/ENCYCLOPEDIE/MEDICAL](http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical)

Parmi ces structures, le testicule est l'élément central de la fertilité et concentre l'essentiel des publications, il sera donc le seul à être abordé au sein de cet exposé.

### 3.1.1 HISTOLOGIE DU TESTICULE

Le testicule est un organe pair. Il est, avec l'épididyme et la portion initiale des canaux déférents, entouré par une tunique externe : la tunique vaginale et situé au sein du sac scrotal à l'extérieur de l'abdomen. Cette localisation permet de maintenir une température comprise entre 34 et 35 °C, indispensable à un déroulement optimal de la spermatogenèse.

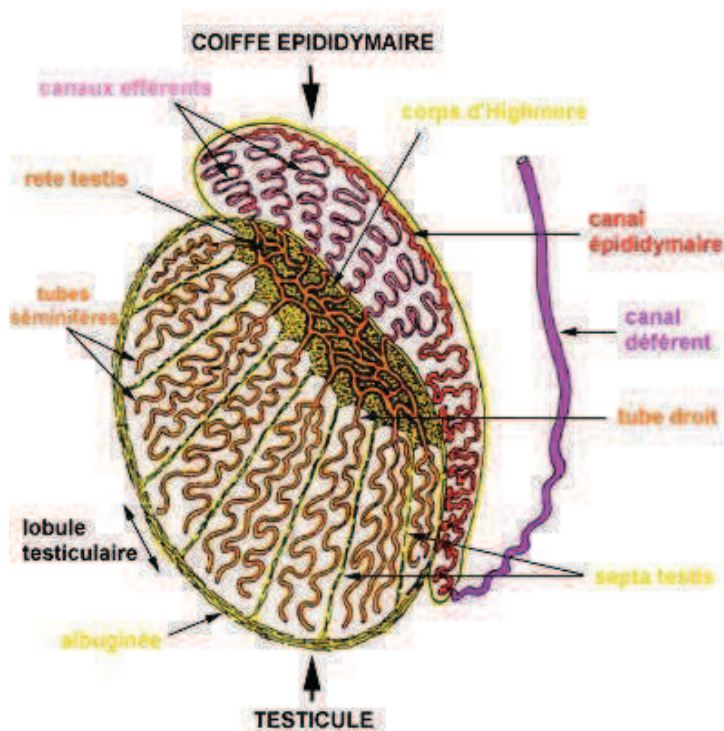


FIGURE 4 : SCHEMA D'UNE COUPE SAGITALE DE TESTICULE. SOURCE DE L'IMAGE : [HTTP://BAC-SC-REP.E-MONSITE.COM](http://BAC-SC-REP.E-MONSITE.COM)

La partie postérieure du testicule est en contact avec l'épididyme, les deux structures étant suspendues au sein du scrotum par le cordon spermatique. Ce dernier contient le canal déférent, l'artère testiculaire ainsi qu'un plexus veineux : le plexus pampiniforme. L'innervation sanguine est réalisée par des rameaux du plexus spermatique.

Le testicule est entouré par une tunique interne : l'albuginée, riche en fibres de collagène et contenant des cellules musculaires lisses dans sa partie postérieure. Celle-ci s'épaissit à la partie supérieure du testicule pour former le médastinum testis ou corps d'Highmore, traversé par le rete testis. Depuis le médastinum testis, des septa s'enfoncent dans le corps testiculaire pour former les

cloisons interlobulaires conjonctives. Ces cloisons délimitent entre 250 et 300 lobules contenant chacun 2 à 3 tubes séminifères flexueux (Il faut noter que cette organisation en lobules n'est pas présente chez la souris). Chaque tube séminifère, long d'environ 80 cm et large de 150 à 300  $\mu\text{m}$ , présente une forme en U dont chaque extrémité s'abouche dans le rete testis par l'intermédiaire des tubes droits (Figure 4).

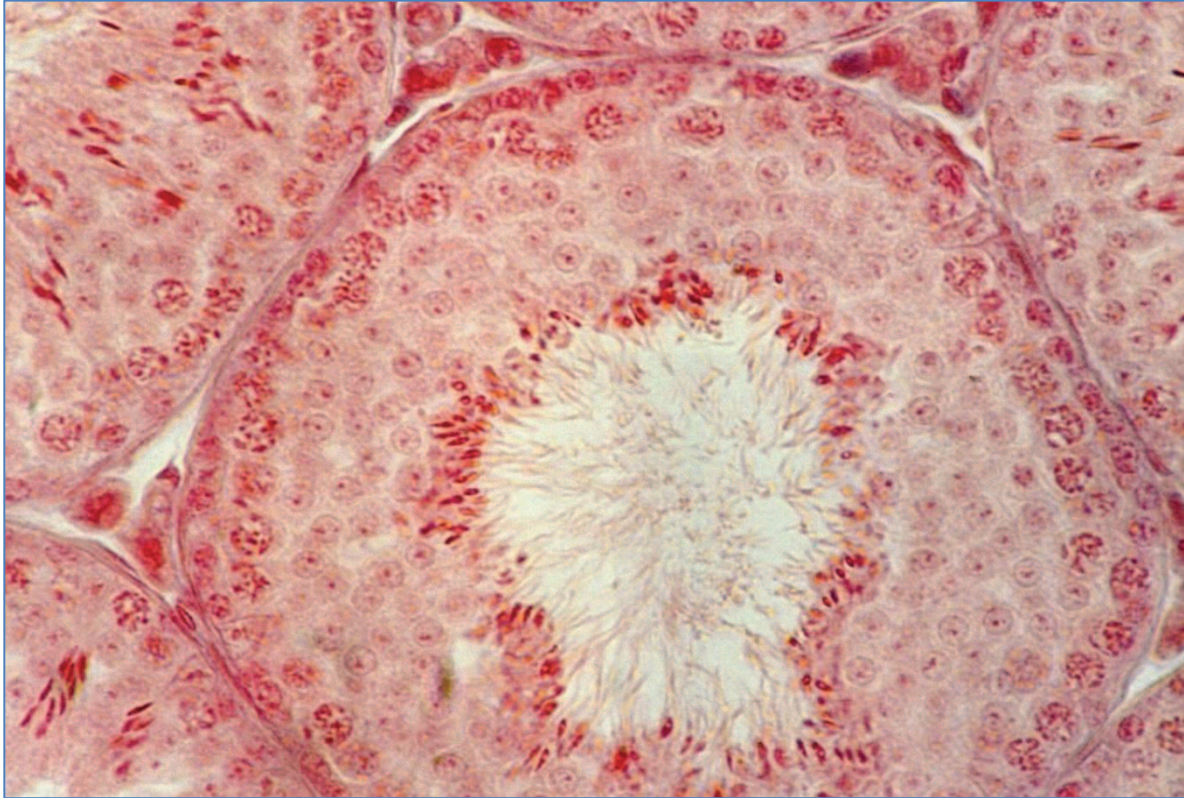


FIGURE 5 : COUPE HISTOLOGIQUE D'UN TUBE SEMINIFERE OBSERVE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE APRES COLORATION AU TRICHROME DE MASSON GROSSISSEMENT X 400. SOURCE DE L'IMAGE : [HTTP://COLVIBSVT.SPACE-BLOGS.NET](http://COLVIBSVT.SPACE-BLOGS.NET)

Les tubes séminifères sont constitués d'une lumière centrale entourée d'un épithélium spécialisé comprenant deux populations : les cellules de Sertoli (somatiques) et les cellules germinales. Cet épithélium repose sur une gaine péritubulaire de 3 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, formée d'une membrane basale bien définie entourée par plusieurs assises de cellules musculaires lisses : les cellules péritubulaires dont la contraction permet l'évacuation du fluide testiculaire. Plus en périphérie, des fibrilles de collagène et des fibroblastes constituent la partie la plus externe de la gaine, en contact avec la paroi des capillaires sanguins et des vaisseaux lymphatiques (Figure 5).

Les espaces compris entre les tubes séminifères sont occupés par un tissu conjonctif lâche, riche en vaisseaux et en nerfs, au sein duquel sont disséminés de petits amas de cellules interstitielles : les cellules de Leydig. Quelques cellules immunitaires, de type macrophages, y sont également présentes<sup>29</sup>



Le testicule contient de nombreux **types cellulaires**. On retrouve notamment des fibroblastes, des cellules immunitaires, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales... Cet exposé se focalisera toutefois sur les cellules qui sont au cœur de la fonction testiculaire à savoir les cellules de la lignée germinale, les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig<sup>30</sup>.

### **3.1.1.1 CELLULES GERMINALES**

Les cellules de la lignée germinale sont constituées d'un continuum de cellules allant des cellules souches spermatogoniales très peu différenciées aux spermatozoïdes totalement différenciés (Figure 6).

Les **spermatogonies** sont localisées à la périphérie des tubes séminifères au contact de la membrane basale, entre les cellules de Sertoli, à l'extérieur du niveau des jonctions serrées qui relient les prolongements cytoplasmiques des cellules de Sertoli. Elles sont peu nombreuses, avec un diamètre de 9 à 15  $\mu\text{m}$ . Trois aspects cytologiques ont été décrits au microscope photonique selon la morphologie de leur noyau. Les spermatogonies de type Ad (d pour "dark") possèdent un noyau arrondi avec une chromatine finement granuleuse, chromophile occupée par une vacuole centrale. Les spermatogonies de type Ap (p pour "pale") ont un noyau ovalaire, clair avec une chromatine fine et dispersée, renfermant un ou plusieurs nucléoles. Enfin, les spermatogonies de type B sont caractérisées par un noyau arrondi, foncé, avec une chromatine en amas.

Les **cellules souches spermatogoniales** correspondent à une fraction des spermatogonies de type A. Elles se caractérisent par l'expression du co-récepteur GFR $\alpha$ -1 (GDNF family receptor alpha-1) et leur capacité de réponse au Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)<sup>31</sup>. Elles ont la particularité d'être le plus souvent dans un état de quiescence les rendant résistantes aux agressions physiques ou chimiques que peut subir le testicule. Elles sont alors en mesure de restaurer l'intégralité de sa fonction exocrine. La préservation de leur intégrité est un paramètre à prendre en compte dans toute étude de toxicité sur la fonction de reproduction masculine.

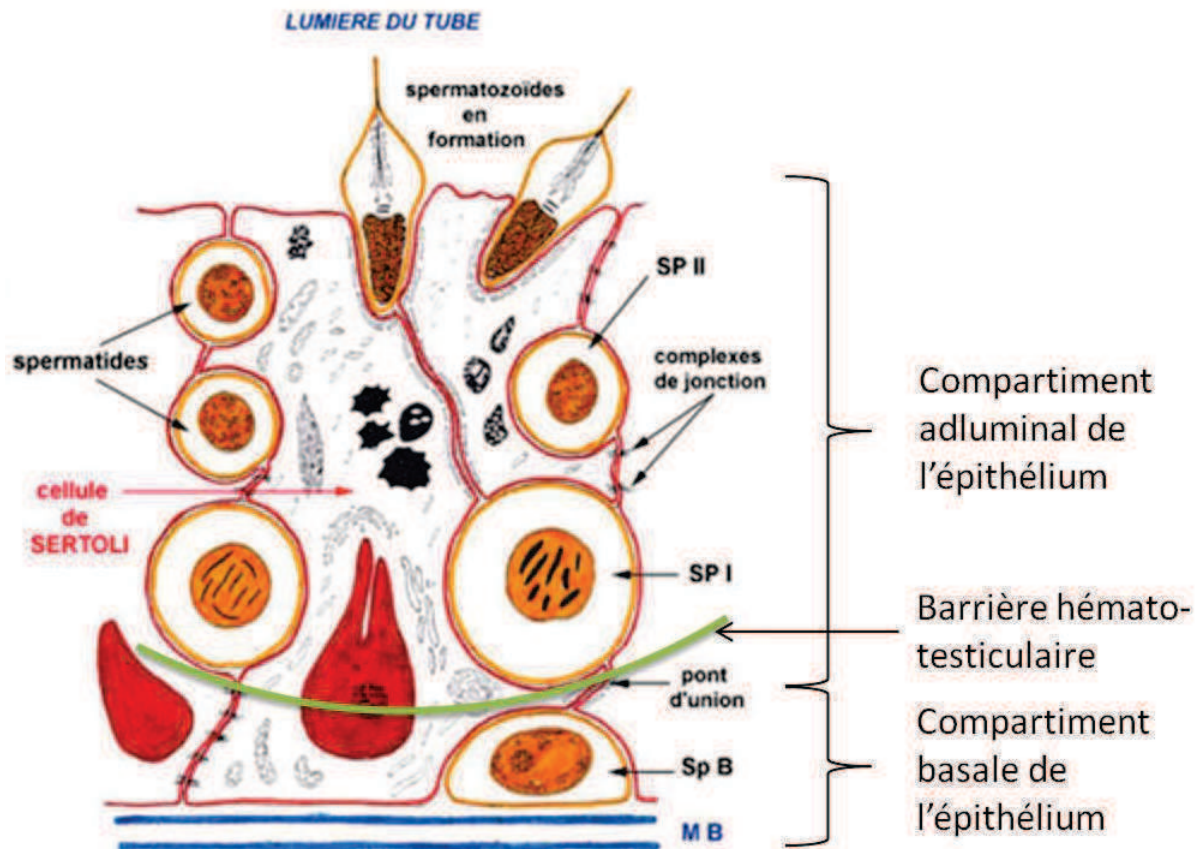


FIGURE 6 : SCHEMA D'UNE CELLULE DE SERTOLI ENTOUREE DE CELLULES GERMINALES A DIFFERENTS STADES DE MATURATION. SP : SPERMATOCYTE, SP B : SPERMATOGONIE DE TYPE B, M B : MEMBRANE BASALE. SOURCE DE L'IMAGE : FR.WIKIPEDIA.ORG

Les **spermatocytes** sont situés dans le compartiment adluminal de l'épithélium des tubes séminifères, juste au-dessus des jonctions serrées établies entre les cellules de Sertoli, et sont divisés en deux populations distinctes. Les spermatocytes I sont de grandes cellules ovalaires au noyau arrondi. Les spermatocytes II sont de plus petites cellules présentant un noyau peu chromophile avec un petit nucléole, ils sont plus difficiles à observer car ils évoluent rapidement au stade suivant.

La localisation des **spermatides** évolue au cours de la spermiogenèse. D'abord situées dans le compartiment adluminal de l'épithélium des tubes séminifères, elles se dirigent lentement vers le pôle luminal de l'épithélium au fur et à mesure de leur différenciation. D'un point de vue morphologique, les spermatides jeunes sont de petites cellules ovoïdes, avec un noyau rond et clair, contenant une ou deux masses nucléolaires. Lors de leur transformation, elles s'allongent et présentent un noyau orienté dans le grand axe de la cellule (spermatides intermédiaires) qui se condense progressivement (spermatides matures).

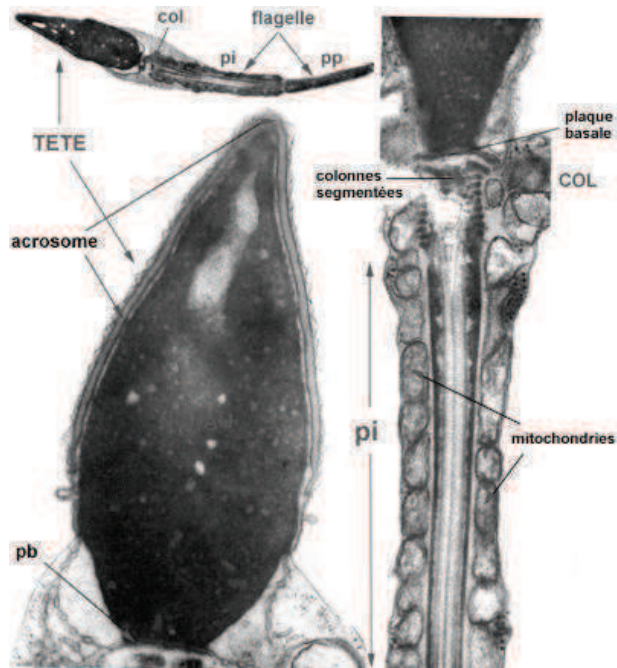


FIGURE 7 : DIFFERENTES PARTIES DU SPERMATOZOÏDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE. PI : PIECE INTERMEDIAIRE, PP : PIECE PRINCIPALE.

Le **spermatozoïde** mature est composé de trois parties : la tête, le col et le flagelle. La tête comprend un noyau allongé et l'acrosome : structure riche en enzymes permettant au spermatozoïde de franchir la zone pellucide qui entoure l'ovocyte au moment de la fécondation. Le flagelle est relié à la tête par le col et se divise en trois portions : la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. Il comprend en son centre le complexe axonémal formé de microtubules, élément moteur du spermatozoïde et à la périphérie une gaine fibreuse entourée, au niveau de la pièce intermédiaire, par une enveloppe mitochondriale (Figure 7).

### 3.1.1.2 CELLULES DE SERTOLI

Les cellules de Sertoli sont pyramidales et allongées. Leur base repose sur la membrane basale de la gaine péricubulaire, leur apex atteint la lumière du tube séminifère. La membrane cytoplasmique latérale est irrégulière formant des cryptes où viennent se loger les cellules de la lignée germinale.

Le noyau est allongé, mesurant de 9 à 12  $\mu\text{m}$  sur son grand axe. Il est perpendiculaire à l'axe du tube, contient une chromatine fine et des nucléoles polymorphes.

Le cytoplasme est riche en organites : réticulum endoplasmique, mitochondries, lysosomes, gouttelettes lipidiques et appareil de Golgi. Il dispose d'un cytosquelette très structuré à base de microtubules et de filaments d'actine.

La cellule de Sertoli assure :



- La protection, le développement et la nutrition des cellules de la lignée germinale
- La phagocytose des corps résiduels lors de la spermiogenèse
- Le processus de spermiation
- La sécrétion d'un liquide riche en protéines et en électrolytes vers la lumière des tubes séminifères
- La synthèse de diverses hormones (inhibine, activine) et de protéines de transport telles que l'ABP (Androgen-Binding Protein)

La cellule de Sertoli est une cellule post-mitotique ne subissant plus de division au sein d'un testicule adulte.

#### **LA BARRIERE HEMATO-TESTICULAIRE**

Les cellules de Sertoli réalisent entre elles, à leur pôle baso-latéral, des jonctions serrées constituant l'élément prépondérant de ce que l'on appelle la barrière hémato-testiculaire. Cette barrière délimite deux zones au sein de l'épithélium du tube séminifère : une **zone basale** dans laquelle se trouvent les spermatogonies et une **zone adluminale** dans laquelle se situent tous les stades de différenciation ultérieure des cellules germinales (Figure 6).

Cette barrière a pour rôle principal d'isoler les cellules germinales, qui ont un fort potentiel antigénique, du système immunitaire.

#### **3.1.1.3 CELLULES DE LEYDIG**

Les cellules de Leydig sont des **cellules endocrines** présentes au sein des espaces inter-tubulaires à proximité des vaisseaux sanguins. Comme la plupart des cellules stéroïdogènes, les cellules de Leydig contiennent des gouttelettes lipidiques ou liposomes, des mitochondries à crêtes tubulaires et un important réticulum endoplasmique lisse.

Après la puberté, sous l'action de la LH (Luteinizing Hormone), la cellule de Leydig synthétise de la testostérone et de la DHT (DiHydroTestostérone). Cette synthèse représente 95% de la production de la testostérone sanguine, le reste étant produit par la corticosurrénale. Néanmoins, la plus grande partie de la testostérone produite par les cellules de Leydig est liée par l'ABP et reste localement dans le testicule, afin de stimuler la spermatogenèse (Voir chapitre 3.1.3).

#### **3.1.2 SPERMATOGENESE (FONCTION EXOCRINE DU TESTICULE)**

La spermatogenèse permet la production des spermatozoïdes au sein du testicule, elle débute dès la puberté et se poursuit jusqu'au décès de l'individu. Elle survient de façon cyclique, un cycle durant 74 jours (35 jours chez la souris).

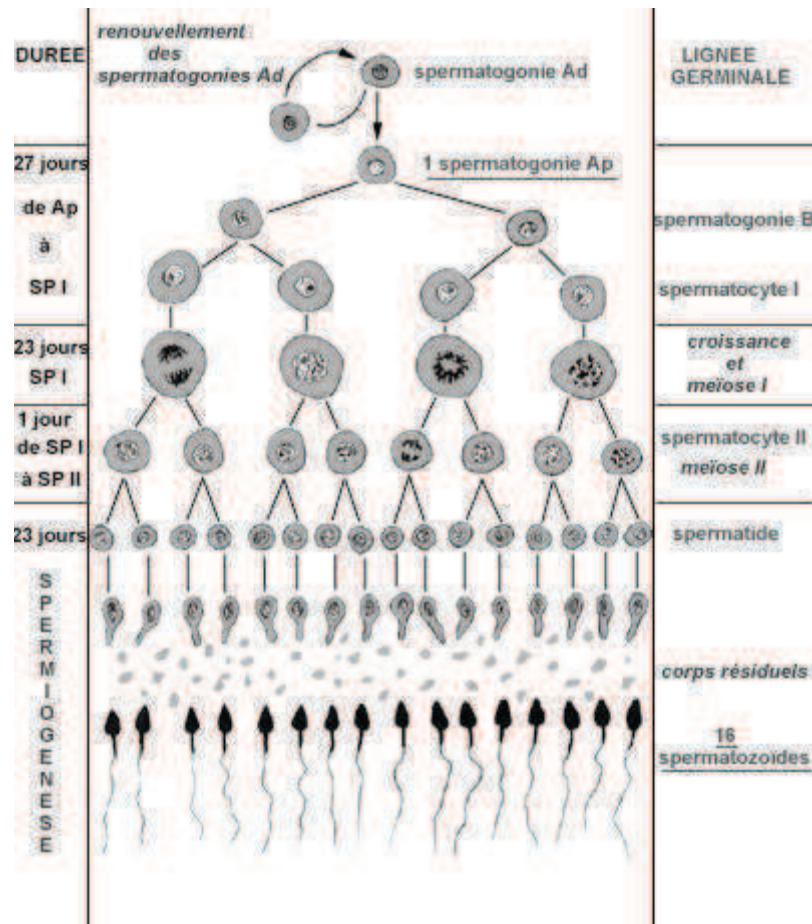


FIGURE 8 : LES DIFFERENTES ETAPES DE LA SPERMATOGENESE. SP : SPERMATOCYTE. SOURCE DE L'IMAGE : FR.WIKIPEDIA.ORG

Les spermatogonies de type Ad se divisent de façon régulière et assurent un renouvellement constant de cellules immatures capables d'entrer dans un cycle de différenciation. Tous les 16 jours, un nouveau cycle débute par l'entrée en mitose d'une nouvelle génération de spermatogonies Ad, toutefois cette entrée en mitose n'est pas concomitante sur toute la longueur du tube expliquant l'observation d'un aspect histologique différent le long du tube séminifère (vague spermatogénétique). A l'issue de cette première mitose, les cellules filles se différencient en spermatogonies Ap. Une deuxième mitose entraîne l'apparition de spermatogonies B, elle est suivie d'une dernière mitose à l'origine de la différenciation en spermatocytes I. L'ensemble de ces divisions a lieu dans la partie basale de l'épithélium, s'ensuit alors le passage du spermatocyte dans la portion adluminale de l'épithélium.

### 3.1.2.1 MEIOSE

A l'issue d'une dernière phase S, le spermatocyte I entre en prophase de la première division méiotique. Celle-ci correspond à la plus longue de la méiose et se découpe en sous-étapes : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène, et diacinèse. Ces étapes correspondent en réalité à la constitution des chromosomes, à leur appariement par paire autour de la ligne de base via le

complexe synaptonémal et à la survenue de phénomènes de recombinaisons génétiques (crossing-over). Survient ensuite les phases suivantes de la première méiose : métaphase, anaphase et télophase.

La seconde méiose est beaucoup plus rapide (1 jour), essentiellement du fait d'une prophase bien plus courte. A l'issue de cette seconde méiose, chaque spermatocyte II va former deux spermatides : c'est le début de la spermiogenèse.

La méiose permet donc de passer d'un spermatocyte avec un contenu tétraploïde en ADN (4N) à 4 spermatozoïdes avec un contenu haploïde en ADN (1N). Elle permet également un assortiment aléatoire des chromosomes du père et de la mère de l'individu dans chaque cellule fille et de nombreuses recombinaisons entre chromosomes appariés, l'ensemble assurant un fort **brassage génétique**.

### 3.1.2.2 SPERMIOGENESE

Lors de la spermiogenèse, les spermatides subissent d'importantes transformations qui les mènent au stade de spermatozoïdes matures :

- Développement du flagelle : depuis le centriole distal, 9 doublets de microtubules périphériques et un doublet central reliés par des ponts de dynéine forment le complexe axonémal, autour duquel viennent s'enrouler des fibres denses et un manchon mitochondrial.
- Formation de l'acrosome en 4 phases successives à partir de l'appareil de Golgi
- Remplacement des histones par des protamines permettant une augmentation du degré de compaction et de protection de l'ADN.

### 3.1.2.3 SPERMATION

Le remplacement des histones par les protamines signe la fin de la spermiogenèse, l'excès de cytoplasme est éliminé par le spermatozoïde sous la forme d'un corps résiduel, rapidement phagocyté par les cellules de Sertoli. Les attaches entre la cellule de Sertoli et le spermatozoïde sont rompues et ce dernier est emporté vers la lumière du tube séminifère : c'est la spermiation. A ce stade le spermatozoïde présente une mobilité réduite, il n'acquerra sa mobilité et son pouvoir fécondant qu'après une maturation terminale dans l'épididyme.

## 3.1.3 LE CONTROLE HORMONALE DE LA FONCTION DE REPRODUCTION MASCULINE

Les fonctions exocrines (spermatogenèse) et endocrines (synthèse de la testostérone) sont régulées par un contrôle hormonal strict : l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 9). L'hypothalamus est une

structure nerveuse située à la base du cerveau et reliée à une petite glande positionnée juste en dessous : l'hypophyse par l'intermédiaire d'un système vasculaire porte. Les neurones hypothalamiques libèrent une neuro-hormone, la gonadolibérine (GnRH - Gonadotrophin Releasing Hormone) de façon pulsatile qui est ensuite véhiculée par le système porte hypothalamo-hypophysaire jusqu'à l'hypophyse. La fixation de la GnRH sur son récepteur stimule la sécrétion de deux hormones par les cellules gonadotropes hypophysaires : la FSH (Follicle-Stimulating Hormone) et la LH. Ces deux hormones sont véhiculées par la circulation générale jusqu'aux testicules.

La LH agit essentiellement sur les cellules de Leydig et stimule la production de testostérone. La testostérone a une action paracrine qui favorise la spermatogenèse et de nombreuses actions systémiques (virilisation, augmentation de la libido, effet anabolisant, protection contre l'ostéoporose...).

La FSH agit essentiellement sur les cellules de Sertoli qui vont synthétiser des facteurs paracrines favorisant la spermatogenèse.

En retour, on observe un double rétrocontrôle négatif :

- De la testostérone sur l'hypothalamus inhibant les productions de GnRH, FSH et LH.
- De l'inhibine, synthétisée par les cellules de Sertoli sous l'action de la FSH, qui inhibe la production de FSH au niveau de l'hypophyse.

Ainsi une diminution de la synthèse de testostérone peut être responsable d'une baisse de la spermatogenèse, tandis qu'une augmentation systémique de la testostérone, des androgènes faibles ou des œstrogènes peut également entraîner une baisse de la spermatogenèse par augmentation du rétrocontrôle négatif sur la synthèse hypophysaire de FSH.

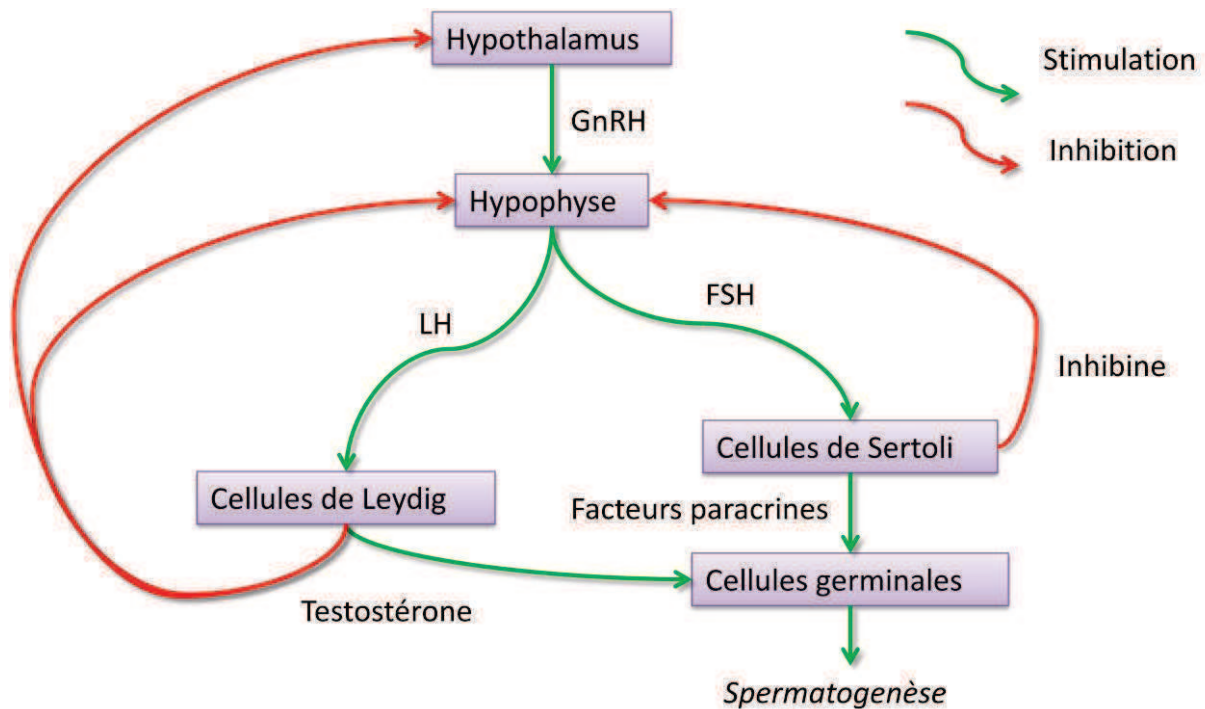


FIGURE 9 : AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAIRE

## 3.2 EXPLORATION DE LA FONCTION DE REPRODUCTION MASCULINE

### 3.2.1 DIFFICULTES LIEES A L'ÉVALUATION DE LA FERTILITE CHEZ L'HOMME

La **fertilité** d'un homme se définit comme sa capacité à se reproduire<sup>32</sup>. Par opposition, l'**infertilité** est définie par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme une absence de grossesse après un an de rapports sexuels réguliers non protégés.

Ces définitions posent d'emblée de nombreuses difficultés :

- Tout d'abord parce que l'infertilité ne peut s'envisager qu'au niveau d'un couple. En effet l'absence d'obtention d'une grossesse après un an de rapports sexuels réguliers non protégés ne présume en rien de la fertilité de chacun des membres du couple. Tout au plus il est possible de dire que l'un des deux membres du couple, au moins, n'est pas fertile.
- La fertilité passée ne présage que partiellement de la fertilité à venir. En effet, un homme ayant déjà eu un enfant avec sa partenaire peut très bien être victime d'une baisse de sa fertilité par la suite qui ne sera pas forcément identifiée par l'individu et qui va l'empêcher de se reproduire à nouveau.
- Enfin il n'existe aucun examen médical capable d'évaluer avec certitude la fertilité d'un individu.

Partant de ces constats, il est difficile de réaliser des études cliniques ayant pour objectif d'évaluer l'impact d'un facteur donné sur la fertilité masculine. De ce fait, de nombreuses études préfèrent évaluer l'impact de ces facteurs sur les résultats des examens médicaux et en particulier sur les caractéristiques du sperme qui sont bien plus facilement objectivables même s'ils s'avèrent moins pertinents.

Il existe plusieurs examens permettant de donner des indications sur la fertilité masculine mais le plus important d'entre eux est le spermogramme.

### **3.2.2 EXAMENS PERMETTANT D'ÉVALUER LES CARACTÉRISTIQUES SPERMATIQUES**

#### **3.2.2.1 LE SPERMOGRAMME**

Le spermogramme vise à évaluer les caractéristiques du sperme d'un patient. Il faut noter que les normes données ici sont celles qui ont été établies par l'OMS en 2010 sur un échantillon de sujets supposés sains, elles ne présagent en rien de la capacité du sperme étudié à initier ou non une grossesse. Le spermogramme se fait après une période d'abstinence de 3 à 5 jours. Les caractéristiques pouvant varier avec l'augmentation du délai d'abstinence sont la numération et le volume (augmentation) et la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes (diminution). Les caractéristiques évaluées lors du spermogramme sont les suivantes :

- Le volume : 95% du volume du sperme correspond au plasma séminal principalement produit par les glandes annexes (prostate 1/3 et vésicules séminales 2/3). La fraction spermatique ne représente que 5% du volume total. Ainsi le volume explore essentiellement le fonctionnement des glandes annexes. Normes > 1,5 ml. Un volume trop faible est appelé hypospermie.
- Le pH : le pH du sperme est le résultat de la somme du pH des sécrétions prostatiques, acide, et du pH des sécrétions des vésicules séminales, basique. Il explore donc lui aussi le fonctionnement des glandes annexes. Normes entre 7,2 et 8.
- La viscosité : le caractère visqueux du sperme est donné par la sécrétion protéique importante réalisée par les vésicules séminales, une liquéfaction secondaire est observable du fait de l'action des enzymes prostatiques. Ce paramètre explore lui aussi le fonctionnement des glandes annexes.
- Le nombre de spermatozoïdes : il s'agit du paramètre le plus important du spermogramme, la dégradation conjointe de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes est souvent le signe d'une altération de la spermatogenèse. Il peut être exprimé par ml ou par éjaculat mais cette seconde expression est bien plus pertinente

dans l'exploration de la fonction testiculaire puisqu'elle s'affranchit du volume spermatique, reflet de la fonction des glandes annexes. Bien que la limite inférieure de la normale soit plus élevée on considère que l'impact d'une diminution du nombre de spermatozoïdes ne sera certain qu'en dessous de 10 millions/éjaculat. Normes > 15 M/ml ou > 39 M/éjaculat. Une diminution du nombre de spermatozoïdes est une oligozoospermie. L'absence de spermatozoïdes à l'examen direct mais la présence après sélection est une cryptozoospermie. L'absence totale de spermatozoïdes est une azoospermie.

- La mobilité des spermatozoïdes : on différencie quatre types de mobilité, progressive rapide, progressive lente, sur place, immobile. Seuls les spermatozoïdes progressifs sont susceptibles de féconder l'ovocyte en fécondation naturelle. La mobilité est évaluée une heure après le prélèvement puis quatre heures après le prélèvement. Normes à 1h : spermatozoïdes progressifs > 32% ; spermatozoïdes mobiles > 40%. Une diminution de la mobilité des spermatozoïdes est une asthénozoospermie.
- La vitalité des spermatozoïdes : elle se mesure après coloration vitale des spermatozoïdes (ex : éosine-nigrosine), seuls les spermatozoïdes vivants peuvent féconder un ovocyte et ce quelque soit le mode de fécondation. La mesure de la mobilité peut permettre d'évaluer de façon indirecte la vitalité puisque seuls les spermatozoïdes vivants peuvent être mobiles, en revanche l'inverse n'est pas vrai. Normes > 58% de spermatozoïdes vivants. Une diminution du pourcentage de spermatozoïdes vivants est une nécrozoospermie.
- La morphologie des spermatozoïdes : deux classifications sont utilisées, la classification de Krüger, la plus utilisée au niveau mondiale et reprise par l'OMS et la classification de David modifiée, la plus utilisée en France. Cette dernière répertorie les anomalies qui peuvent affecter, la tête du spermatozoïde, la pièce intermédiaire et le flagelle après coloration spécifique (ex : Papanicolaou) au microscope optique (x1000). La morphologie des spermatozoïdes est le paramètre du spermogramme le plus stable dans le temps. Normes > 15% de formes normales pour la classification de David modifiée, > 4% de formes normales pour la classification de Krüger. Une altération de la morphologie des spermatozoïdes est une tératozoospermie.

### **3.2.2.2 LA FRAGMENTATION DE L'ADN SPERMATIQUE**

Depuis un certain nombre d'années, de nombreuses études ont évalué l'impact des cassures de l'ADN spermatique sur la fertilité masculine. Ces cassures seraient liées à des défauts de compaction de l'ADN spermatique et/ou à un effet délétère des ROS (Radical Oxygen Species) au moment de la

maturation épидidymaire des spermatozoïdes. Les différentes techniques de mesure de la fragmentation de l'ADN spermatique sont le TUNEL (deoxynucleotydil Transferase dUTP Nick End Labelling assay), le COMET (single-cell electrophoresis assay), le SCD (Sperm Chromatin Dispersion) et le SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) (Figure 10). Même si plusieurs études ont montré que la fragmentation de l'ADN spermatique pouvait réduire les chances d'obtention d'une grossesse en grossesse naturelle ou en procréation médicalement assistée, ainsi que diminuer la qualité embryonnaire et augmenter le risque de fausses couches, les résultats de l'ensemble des publications n'apportent pas un niveau de preuve suffisant pour que l'utilisation de ce test soit indiquée en routine clinique<sup>33</sup>. Toutefois de nombreuses études pratiquent ces tests afin d'évaluer la reprotoxicité de facteurs environnementaux.

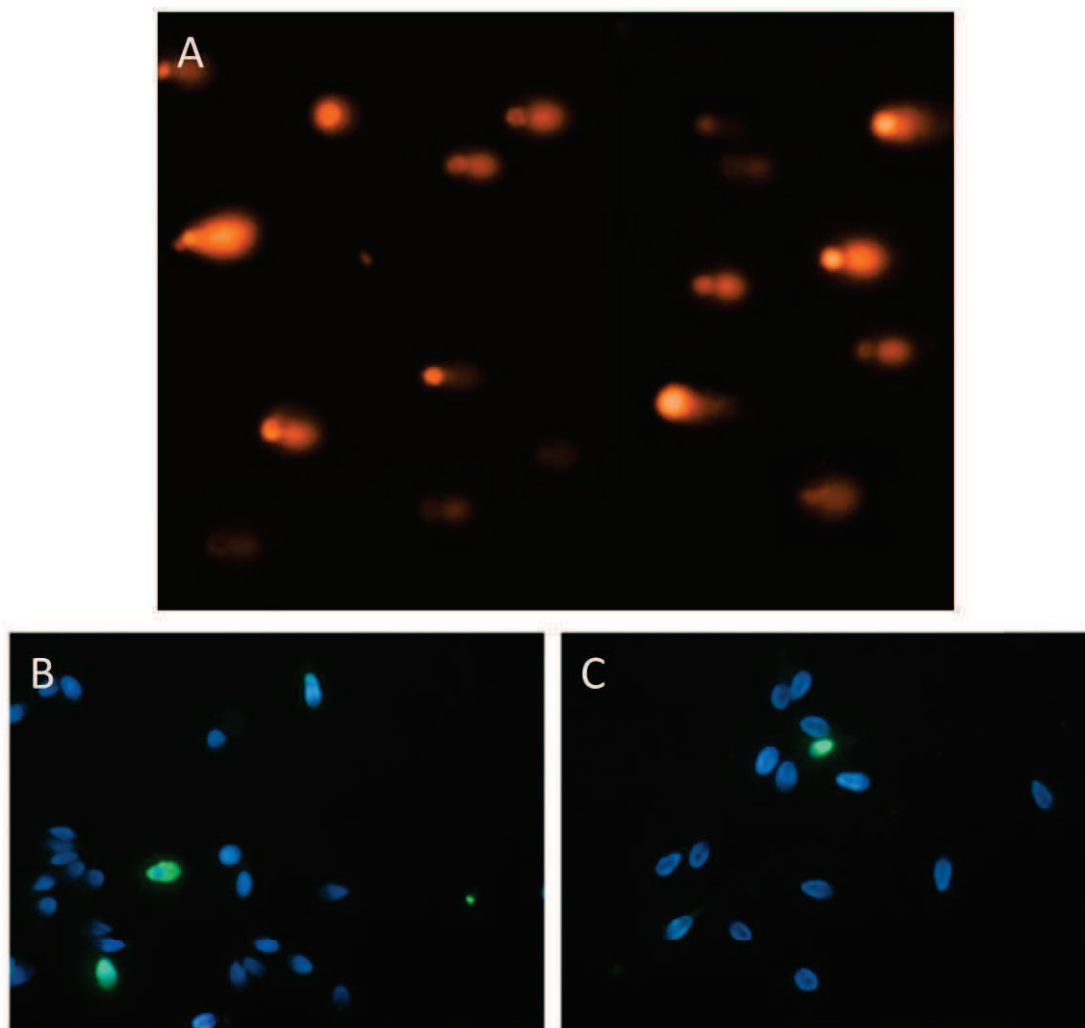


FIGURE 10: EXEMPLES DE TESTS VISANT A EVALUER LA FRAGMENTATION DE L'ADN SPERMATIQUE. A. TEST COMET : LYSER DES CELLULES PUIS MIGRATION DU LYSAT SUR UN GEL D'AGAROSE. APRES MARQUAGE DE L'ADN PAR UN AGENT FLUORESCENT ON OBSERVE UN ETALEMENT DE L'ADN SUR LE GEL PRENANT L'ASPECT D'UNE COMETE, PLUS LA QUEUE DE LA COMETE EST IMPORTANTE PLUS L'ADN EST FRAGMENTE (SOURCE DE L'IMAGE : IBIDI.COM). B ET C. TEST TUNEL AVEC MARQUAGE FLUORESCENT, LES SPERMATOZOÏDES AYANT UN ADN FRAGMENTE SONT MARQUES EN VERT (SOURCE DE L'IMAGE : WWW.RENOANNIBALLO.IT).



## 4 IMPACT DES NANOMATERIAUX SUR LA FONCTION DE REPRODUCTION MASCULINE

Les chapitres 4.1 à 4.4 sont, pour une grande partie, une synthèse inspirée des travaux réalisés par l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) et présentés sur leur site internet<sup>34</sup>

### 4.1 LES NANOMATÉRIAUX

La commission européenne a proposé en 2011 une définition du terme « nanomatériau ». Selon elle : « un nanomatériau est un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm. »<sup>35</sup>

Selon la norme ISO TS 80004-1 : « un nanomatériau est un matériau dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique c'est-à-dire comprise approximativement entre 1 et 100 nm ou qui possède une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. »<sup>36</sup>

Il existe deux grandes familles de nanomatériaux : les nano-objets et les matériaux nanostructurés.

#### 4.1.1 LES NANO-OBJETS

Ce sont des matériaux dont une, deux ou trois dimensions externes sont comprises entre 1 et 100 nm. Parmi les nano-objets, il est possible de distinguer trois catégories :

- les nanoparticules qui désignent des nano-objets dont les trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique (nanoparticules de latex, d'oxyde de zinc, de fer et de cérium, d'alumine, de dioxyde de titane, de carbonate de calcium...)
- les nanofibres, nanotubes, nanofilaments ou nanobâtonnets qui se rapportent à des nano-objets dont deux dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et la troisième dimension significativement supérieure (nanotubes de carbone, nanofibres de polyester, nanotubes de bore...).
- les nano-feuillets, nano-plats ou nano-plaquettes qui définissent des nano-objets dont une dimension externe se situe à l'échelle nanométrique et les deux autres dimensions sont significativement supérieures (nano-feuillets d'argile, nano-plaquettes de séléniure de cadmium, etc.).

Les nano-objets peuvent être utilisés en tant que tels sous forme de poudre, de suspension liquide ou de gel.

#### **4.1.2 LES MATÉRIAUX NANOSTRUCTURÉS**

Ils possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. Parmi les matériaux nanostructurés, on distingue plusieurs familles :

- les agrégats (par des liaisons chimiques fortes) et agglomérats (par des liaisons physiques faibles) de nano-objets dont la taille est sensiblement supérieure à 100 nm.
- les nanocomposites. Ces matériaux sont composés pour tout ou partie de nano-objets qui leur confèrent des propriétés améliorées ou spécifiques de la dimension nanométrique. Les nano-objets sont incorporés dans une matrice ou sur une surface afin d'apporter une nouvelle fonctionnalité ou de modifier certaines propriétés mécaniques, magnétiques, thermiques, etc. Les polymères chargés de nanotubes de carbone utilisés dans le secteur des équipements sportifs, afin d'améliorer leur résistance mécanique et de diminuer leur poids en sont un exemple.
- les matériaux nanoporeux. Ces matériaux possèdent des pores de taille nanométrique. Les aérogels de silice sont des matériaux nanoporeux qui présentent d'excellentes propriétés d'isolation thermique.

#### **4.1.3 NANOMATERIAUX MANUFACTURES ET PARTICULES ULTRA-FINES**

Les nanomatériaux produits de façon intentionnelle par l'Homme à des fins d'applications précises et possédant des propriétés spécifiques sont nommés « nanomatériaux manufacturés ». Parmi ces nanomatériaux manufacturés, certains sont produits depuis déjà de nombreuses années dans des tonnages importants tels que le dioxyde de titane, le noir de carbone, l'alumine, le carbonate de calcium ou la silice amorphe. D'autres plus récents sont fabriqués dans des quantités moindres tels que les nanotubes de carbone, les quantum dots ou les dendrimères.

Il existe également des nanomatériaux produits par l'Homme de façon non intentionnelle, appelés parfois particules ultrafines, issus de certains procédés thermiques et mécaniques tels que les fumées de soudage ou de projection thermique, les émissions de moteurs à combustion...

Enfin, des particules ultrafines naturelles sont présentes dans notre environnement, à l'image des fumées volcaniques ou des virus.

## 4.2 APPLICATIONS ET EXPOSITION AUX NANOMATÉRIAUX

Le passage de la matière à la dimension nanométrique confère des propriétés très intéressantes aux nanomatériaux : une résistance mécanique accrue, une réactivité chimique plus importante, une conductivité électrique supérieure et des capacités de fluorescence. A titre d'exemple, les nanotubes de carbone sont, à section équivalente, cent fois plus résistant que l'acier et six fois plus léger. Ces nouvelles propriétés ont permis des avancées technologiques importantes dans un grand nombre de domaines tels que l'aéronautique, l'informatique ou la santé. Voici quelques exemples d'applications des nanoparticules :

- Automobile, aéronautique, aérospatial : matériaux plus résistants et plus légers ; peintures aux couleurs originales, plus durables et autonettoyantes ; additifs pour diesel assurant une meilleure combustion ; pneumatiques plus durables et recyclables...
- Electroniques et communications : augmentation du volume mémoire, processeurs plus rapides, écrans plats...
- Agroalimentaire : Emballages actifs, colorants, acidifiants, émulsifiants...
- Chimie et matériaux : pigments, poudres céramiques, inhibiteurs de corrosion, catalyseurs multifonction, textiles antibactériens...
- Construction : ciments autonettoyant et anti-pollution, vitrages autonettoyants et anti-salissures, peintures, vernis, colles, mastics
- Santé : ciblage thérapeutique, adjuvants vaccinaux, traceur pour imagerie médicale...
- Cosmétique : crème solaire transparente, dentifrice abrasif, maquillage avec une meilleure tenue...
- Energie : cellules photovoltaïques nouvelle génération, fenêtres « intelligentes », isolation...
- Ecologie : pesticides et herbicides plus efficaces...
- Défense : systèmes de surveillance miniaturisés, système de guidage, textiles légers...

Les hommes ont de tous temps été exposés aux particules ultrafines. Encore aujourd'hui, les particules ultrafines d'origine naturelles (érosion éolienne, éruption volcanique, sels marins, biomasse...) constituent plus de 90% des particules émises dans l'atmosphère avec plus de 20 millions de tonnes produites chaque année<sup>37,38</sup>. Les particules ultrafines d'origine anthropiques (suies industrielles, hydrocarbures, nitrates...) sont également présentes depuis de nombreuses années. Toutefois, l'émergence des nanotechnologies est susceptible d'accroître l'exposition aux nanoparticules à la fois en quantité mais également en dangerosité du fait des propriétés inédites de ces nouvelles nanoparticules. Cette exposition concerne à la fois le grand public, particulièrement du

fait des applications en agroalimentaire, chimie, santé et cosmétique, mais elle concerne également et particulièrement les professionnels. On distingue deux types d'exposition professionnelle :

- L'exposition lié à des procédés dont la finalité n'est pas la production de nanomatériaux mais dont la mise en œuvre en génère (dans ce cas il est question de particules ultrafines). Ces procédés comprennent des procédés thermiques (fonderie, métallisation, soudage, coupe laser, traitement thermique de surface...), des procédés mécaniques (ponçage, perçage, polissage...) et des combustions (moteur diesel, incinération, crémation...)
- L'exposition liée à la fabrication et à l'utilisation intentionnelle de nanomatériaux. Toutes les étapes de production, de réception et d'entreposage des matières premières jusqu'au conditionnement et à l'expédition des produits finis, en passant par le transfert éventuel de produits intermédiaires peuvent exposer les salariés aux nanomatériaux. La nature des nanomatériaux (poudre, suspension dans un liquide, gel...), les méthodes de synthèse utilisées (procédé en phase gazeuse ou en phase liquide), le degré de confinement des différentes étapes et la capacité des produits à se retrouver dans l'air ou sur les surfaces de travail constituent les principaux paramètres qui influent sur le degré d'exposition. De même, l'utilisation et plus précisément la manipulation et l'incorporation dans diverses matrices et l'usinage de nanomatériaux constituent des sources d'exposition supplémentaires.

Au final, en dehors, des applications dans le domaine médical, l'exposition des populations se fait par trois voies privilégiées :

- La voie respiratoire qui concerne avant tout les professionnels
- La voie cutanée
- La voie digestive

## **4.3 TOXICITÉ DES NANOMATÉRIAUX**

### **4.3.1 TOXICITÉ HUMAINE DES NANOMATÉRIAUX**

Cette importance croissante de l'exposition aux nanoparticules a amené la communauté scientifique à s'interroger sur leur toxicité potentielle pour l'homme et pour l'environnement. Ainsi, en 2014, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a publié un rapport d'expertise dans lequel elle fait le point sur l'état des connaissances concernant cette toxicité<sup>39</sup>.

Il est tout d'abord démontré que les nanoparticules sont capables de traverser la barrière alvéolo-capillaire et de là, de se distribuer dans l'organisme. Cette capacité ainsi que leur biopersistance dépendent de leurs caractéristiques physico-chimiques. En revanche, le franchissement des autres barrières (cutanée, digestive, placentaire, hémato-testiculaire et hémato-encéphalique) reste encore à confirmer.

Une fois dans l'organisme, plusieurs nanoparticules (nanotubes de carbone et dioxyde de titane) ont montré un caractère génotoxique. Cette génotoxicité peut être liée à l'action directe des particules sur l'ADN ou se faire via la production de radicaux libres. Par ailleurs, des effets cancérigènes ont été mis en évidence pour plusieurs nanoparticules, toutefois l'ANSES déplore que les études réalisées le soient le plus souvent avec des doses de nanoparticules trop importantes difficilement extrapolables à une exposition humaine réaliste. De plus ils constatent également que les études s'intéressant à la neurotoxicité ou à la reprotoxicité des nanoparticules sont encore trop peu nombreuses.

Plusieurs nanomatériaux sont capables d'avoir des effets immunomodulateurs. Certaines nanoparticules sont ainsi utilisées comme adjuvant vaccinaux<sup>40</sup>. Toutefois ces effets immunomodulateurs sont susceptibles d'entraîner des réactions inflammatoires inappropriées et d'être responsables d'allergies. Des effets immunosuppresseurs ont également été rapportés.

L'ANSES note aussi l'existence de preuves suggérant que l'exposition *in utero* et postnatale aux nanomatériaux est possible, avec des résultats indiquant des changements dans la plasticité synaptique, l'expression des gènes et le comportement. Des études plus robustes sont cependant nécessaires afin de permettre l'évaluation des risques neurocomportementaux suite à une exposition à des nanomatériaux.

Au final, les conclusions données par l'ANSES sont que malgré l'utilisation de doses de nanomatériaux trop élevées et des voies d'exposition souvent peu réalistes, les études évaluant leur toxicité sont suffisamment probantes pour que des précautions soient prises quant à leur utilisation et pour que de nouvelles explorations soient réalisées. En 2009 la proportion d'étude s'intéressant à la toxicité des nanomatériaux par rapport au nombre totale d'étude sur ce sujet n'était que de 2%, elles sont au aujourd'hui de 8%. Cette prise de conscience de la communauté scientifique est saluée par l'ANSES mais rend d'autant plus nécessaire une harmonisation des pratiques entre laboratoire et le développement de nanomatériaux de référence permettant de valider les tests de toxicité dans les conditions expérimentales de chaque laboratoire.

### 4.3.2 PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES INFLUANT SUR LA TOXICITE DES NANOMATERIAUX

Dans son travail de synthèse, l'INRS aboutit à la conclusion qu'il n'est pas possible d'émettre une hypothèse générale sur la toxicité des nanomatériaux. Chaque nanomatériau, y compris pour une même composition chimique, possède un profil toxicologique qui lui est propre. Il est à ce jour impossible de prédire a priori les effets potentiels d'un nanomatériau du fait de la multiplicité des paramètres physico-chimiques influençant la toxicité. Ces paramètres sont principalement :

- La composition chimique : la nature chimique des nanomatériaux (notamment métallique), ainsi que la présence d'autres composés (comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les métaux de transition : fer, nickel, etc.) adsorbés sur leur surface, sont susceptibles d'influer sur leur toxicité. En effet, les métaux de transition interviennent dans des réactions aboutissant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui ont un rôle essentiel dans les processus de toxicité cellulaire et d'inflammation.
- La taille : la taille conditionne le site de dépôt des nanomatériaux lors des expositions par voie respiratoire. Par ailleurs, une diminution de la taille des particules ou des fibres favorise leur pénétration dans les cellules, le passage des barrières biologiques et leur migration vers divers organes.
- La surface spécifique : la surface spécifique d'une nanoparticule est proportionnellement à sa masse plus élevée que celle d'une particule de taille plus grande. De ce fait, d'avantage d'atomes sont présentés à la surface de la particule lui conférant une réactivité chimique plus grande. Ainsi, plus la surface spécifique d'une particule est grande plus sa toxicité est susceptible d'être importante.
- Le nombre : l'augmentation du nombre des particules favorise la pénétration et la persistance des nanomatériaux dans les tissus de l'organisme, en saturant les systèmes de clairance pulmonaire.
- La forme : la toxicité semble être aggravée par la forme fibreuse ou filamenteuse des nano-objets. Les particules longues comme les nanotubes ou les nanofilaments seraient plus toxiques que les particules sphériques de composition chimique identique.
- La structure : la structure cristalline, pour les composés minéraux (comme la silice), peut contribuer à moduler les propriétés toxicologiques des nanomatériaux. Par exemple, dans le cas du dioxyde de titane, la forme anatase génère spontanément plus d'espèces réactives de l'oxygène et entraîne plus d'effets cytotoxiques que la forme rutile.

- La solubilité : elle conditionne le devenir des nanomatériaux dans l'organisme humain. La production d'espèces ionisées à partir de nanomatériaux plus ou moins solubles peut contribuer au développement d'effets toxiques.
- Le degré d'agrégation et d'agglomération : dans la réalité, les nanoparticules sont rarement isolées les unes par rapport aux autres en tant que particules primaires mais ont tendance à s'agréger (par des liaisons chimiques « fortes ») ou s'agglomérer (par des liaisons physiques « faibles ») en amas de plus grande dimension pouvant atteindre plusieurs dizaines de micromètres. Ces deux phénomènes peuvent modifier le dépôt des nanomatériaux dans l'organisme, leur pénétration dans les cellules et leurs effets biologiques.
- Les méthodes de fabrication, les traitements de surface ainsi que le vieillissement des nanomatériaux au cours de leur cycle de vie sont également susceptibles d'influer sur leur toxicité

Outre les paramètres physico-chimiques, d'autres facteurs peuvent déterminer les effets toxicologiques des nanomatériaux sur l'organisme :

- facteurs liés à l'exposition : voies de pénétration dans l'organisme, importance et durée de l'exposition,
- facteurs liés à l'organisme exposé : susceptibilité individuelle, paramètres biocinétiques.

Les données toxicologiques actuelles, bien que parcellaires, incitent à s'interroger sur les risques encourus suite à des expositions à certains nano-objets, y compris pour des composés réputés inertes (sans effet spécifique) à l'échelle micrométrique. Un certain nombre d'études démontrent déjà clairement que les nanomatériaux présentent une toxicité plus grande et sont à l'origine d'effets inflammatoires plus importants que les objets micrométriques de même nature chimique.

#### **4.4 RÉGLEMENTATION**

A l'heure actuelle les possibilités d'établir une réglementation spécifique concernant les nanomatériaux sont limitées par le manque de connaissance sur leur toxicité réelle et plus particulièrement par l'incapacité des autorités à prédire le risque qu'elles représentent pour la santé des populations.

Ainsi, il n'existe pour l'instant ni en France ni en Europe de valeurs limites d'exposition professionnelles aux nanomatériaux. Certaines agences, comme le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) aux Etats-Unis d'Amérique, ont défini des valeurs limites

d'exposition pour certaines nanoparticules comme le dioxyde de titane ( $0,3 \text{ mg/m}^3$ ) ou les nanotubes de carbone ( $1 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ ). Ils précisent toutefois que les chiffres donnés ne permettent en rien d'exclure le risque de maladies liées à cette exposition.

De même, aucune réglementation spécifique ne régit actuellement la manipulation de nanomatériaux en France. Il n'existe pas pour autant de vide réglementaire. En effet, les principes généraux relatifs à la protection de la santé des salariés demeurent applicables, ainsi que les textes consacrés à la mise sur le marché des substances chimiques, des médicaments, des produits cosmétiques ou des aliments.

Afin de mieux connaître les « substances à l'état nanoparticulaire » et leurs usages, de disposer d'une traçabilité des filières d'utilisation, d'une meilleure connaissance du marché et des volumes commercialisés et enfin à collecter des informations sur leurs propriétés toxicologiques et écotoxicologiques, le gouvernement a mis en place un dispositif rendant obligatoire la déclaration annuelle des nanomatériaux mis sur le marché en France. Cette déclaration, qui est entrée en vigueur au 1er janvier 2013, concerne les fabricants, les importateurs et les distributeurs de telles substances mises sur le marché en France. La déclaration doit comporter l'identité du déclarant, la quantité, les propriétés physico-chimiques et les usages de ces substances ainsi que les noms des utilisateurs professionnels. De même, toutes les informations disponibles relatives aux dangers de ces substances et aux expositions auxquelles elles sont susceptibles de conduire, ou utiles à l'évaluation des risques pour la santé et l'environnement, doivent être transmises.

## **4.5 BIODISTRIBUTION, BIOPERSISTANCE ET TOXICITE TESTICULAIRE DES NANOMATERIAUX**

Comme le souligne l'ANSES, le nombre d'étude concernant l'impact des nanomatériaux sur la fonction de reproduction reste limité. Toutefois, ce sujet a pris de l'ampleur durant ces cinq dernières années et nous allons tenter dans ce chapitre de faire un bilan exhaustif de l'ensemble des publications parues dans ce domaine. Pour ce faire, nous présenterons le résultat de cette bibliographie en suivant les trois axes développées par le LINA à savoir la biodistribution, la biopersistance et la biotoxicité testiculaire des nanomatériaux. Lorsque cela était possible, les articles parus ont été résumés sous la forme de tableaux qui permettront au lecteur d'entrer dans le détail de chacune des publications.



### 4.5.1 BIODISTRIBUTION TESTICULAIRE DES NANOMATERIAUX

Les études traitant de la biodistribution testiculaire des nanoparticules ont été listées dans le Tableau 3.

Equipe	Modèle animal	Modèle de particules	Concentration des NP	Voie et durée d'exposition	Méthode de mesure	Résultats
<b>Araujo et al. 1999<sup>41</sup></b>	Rats adultes mâles et femelles	NP de polyméthyl méthacrylate radiomarqué au <sup>14</sup> C et dilués dans différents surfactant pour faciliter l'absorption intestinale.	2,5 mg	Voie orale par gavage. Une seule exposition	Mesure de la radioactivité dans un compteur à scintillation.	Distribution testiculaire maximale dans les premières heures suivant l'administration à hauteur de $1/6 \times 10^4$ . Ratio légèrement dépendant du surfactant utilisé.
<b>Kim et al. 2006<sup>42</sup></b>	Souris mâles adultes	NP de silice contenant de l'isothiocyanate de rhodamine B. Taille : 50 nm	10 mg/kg 25 mg/kg 50 mg/kg 100 mg/kg Contrôle	Injection intra-péritonéale 4 semaines	Fluorescence tissulaire par microscopie confocale Ionogramme et NFS	Présence d'une fluorescence testiculaire importante qui selon les auteurs atteste d'une distribution testiculaire des NP et un franchissement de la BHT
<b>Kwon et al. 2008<sup>43</sup></b>	Souris adultes	NP de silice contenant de l'isothiocyanate de rhodamine B. Taille : 50 nm	Basse : $4,89 \times 10^5$ NP/cm <sup>3</sup> Haute : $9,34 \times 10^5$ NP/cm <sup>3</sup> Contrôle	Voie respiratoire 4 semaines, 4h/j, 5j/s	Fluorescence tissulaire par microscopie confocale	Distribution testiculaire importante, supérieure aux autres organes.
<b>De Jong et al. 2008<sup>44</sup></b>	Rats mâles adultes	NP d'or. Taille : 10 nm, 50 nm, 100 nm, 250 nm	De $5,1 \times 10^{12}$ ou 80 µg pour les NP de 10 nm à $3,2 \times 10^8$ ou 10 µg pour les NP de 250 nm	Injection intraveineuse unique. Mesures à 24h	Concentration tissulaire en or par ICP-MS	Distribution testiculaire uniquement pour les NP de 10 nm à un ratio d'environ $1/10^4$ .
<b>Kim et al. 2010<sup>45</sup></b>	Rats adultes	NP d'argent. Taille : 56 nm	30 mg/kg/j 125 mg/kg/j 500 mg/kg/j	Voie orale 90 j	Mesure de la concentration en Ag par SAA	Distribution testiculaire selon la dose : 6.56 µg/g, 11,84 µg/g 23.75 µg/g. Soit environ $1/10^6$ .
<b>Park et al. 2010<sup>46</sup></b>	Souris adultes	NP d'argent. Taille 22 nm, 42 nm, 71 nm et 323 nm.	1 mg/kg/j 0.25 mg/kg/j, 0.5 mg/kg/j ou 1 mg/kg/j pour les 42 nm	Voie orale pendant 14 j (ou 28 j pour les 42 nm)	Mesure de la concentration en Ag par ICP-MS	Distribution testiculaire pour les 22 nm et les 42 nm. Pas de quantification possible les unités ne sont pas données.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Lankveld et al. 2010</b> <sup>47</sup>	Rats mâles adultes	NP d'argent. Taille 20 nm, 80 nm et 110 nm	20 nm : 23.8 µg/ml 80 nm : 26.4 µg/ml 110 nm : 27.6 µg/ml.	Voie intraveineuse. 1 injection/j pendant 5 j	Mesure de la concentration en Ag par ICP-MS	Distribution testiculaire de toutes les NP. Elle est maximale à J6 pour les 20 nm : 1/10 <sup>3</sup> .
<b>Bai et al. 2010</b> <sup>48</sup>	Souris mâles adultes	Nanotubes de carbone radiomarqués	5 mg/kg	Injection intraveineuse unique ou 5 injections sur 13 jours.	Mesure de la radioactivité par compteur gamma	Distribution à 24h de 151 ng/g de tissu. Soit environ 1/10 <sup>3</sup> .
<b>Balasubramanian et al. 2010</b> <sup>49</sup>	Rats mâles adultes	NP d'or. Taille : 20 nm	0.2 ml à 15,1 µg/ml	Injection intraveineuse unique Mesure à J1, S1, M1 et M2	Concentration tissulaire en or par ICP-MS	Distribution testiculaire faible mais significative à M1 et M2 de l'ordre de 1/10 <sup>4</sup>
<b>Geraets et al. 2012</b> <sup>50</sup>	Rats mâles adultes	NP d'oxyde de cérium. Taille fournisseur : 5-10 nm, 40 nm et 5000 nm	Dose totale estimée : 5000 nm : 4.24 mg 40 nm : 1.54 mg 5-10 nm : 0.83 mg	Inhalation : 6h/j pendant 1j ou 28j.	Concentration tissulaire en Cérium par ICP-MS	Distribution testiculaire plus faible que dans les autres organes après inhalation unique mais phénomène d'accumulation sur 28j pour une des particules
<b>Morishita et al. 2012</b> <sup>51</sup>	Souris mâles adultes	NP de silice. Taille 70 nm et 300 nm.	0.8 mg	Injection intraveineuse 2 jours consécutifs. Mesure à 48h ou à S1	Compte des particules en MET	Distribution testiculaire des particules de 70 nm mais pas celles de 300 nm. Franchissement de la BHT.
<b>Van der Zande et al. 2012</b> <sup>52</sup>	Rats mâles adultes	NP d'argent ou AgNO <sub>3</sub> . Taille : 15 fonctionnalisées par du polyvinylpyrrolidone et 20 nm non fonctionnalisées	NP : 90 mg/kg AgNO <sub>3</sub> : 9 mg/kg	Voie orale 4 semaines	Concentration tissulaire en Ag par SAA et compte particulaire par SP-ICP-MS	Distribution testiculaire d'argent AgNO <sub>3</sub> > NP d'Ag.
<b>Lee et al. 2013</b> <sup>53</sup>	Rats adultes	NP d'argent : Taille : 10 nm, 25 nm.	100 mg/kg/j 500 mg/kg/j	Voie orale 4 semaines	Concentration tissulaire en argent par SAA	Distribution testiculaire de 400 ng/g pour la faible dose et 800 ng/g pour la forte dose. Soit environ 1/10 <sup>6</sup> de la dose totale ingérée
<b>Gao et al. 2013</b> <sup>54</sup>	Souris mâles	NP de dioxyde de titane. Taille	2.5 mg/kg/j	Voie orale	Mesure de la concentration en Ti par ICP-MS.	Distribution testiculaire. Environ

	adultes	294 nm	5 mg/kg/j 10 mg/kg/j	Pendant 90 j	Analyse chimique des coupes histologiques par Raman	1/10 <sup>5</sup> . Franchissement de la BHT
<b>Lee et al. 2013</b> <sup>55</sup>	Lapins	NP d'argent recouvertes de citrate	5 mg/kg 0.5 mg/kg (soit 12 mg)	Injection intraveineuse unique Mesure à J1, J7 et J28	Mesure de la concentration en Ag par ICP-MS.	Distribution testiculaire à tous les temps d'analyse. Environ 1/10 <sup>3</sup> . Excrétion biliaire prédominante.
<b>Wang et al. 2013</b> <sup>56</sup>	Souris mâles adultes	NP d'argent. Taille 25 nm	1.3 mg/kg/2j	Injection intraveineuse pendant 4 sem. Tous les 2j.	Mesure de la concentration en Ag par ICP-MS.	Distribution testiculaire à tous les temps d'analyse environ 1/10 <sup>4</sup>
<b>Wang et al. 2013</b> <sup>57</sup>	Rats adultes	NP de chrome cobalt	20 µg/kg 100 µg/kg 500 µg/kg	Injection intra-articulaire 1/semaine pendant 10 semaines	Mesure de la concentration en Cr et en Co par ICP-MS	Distribution testiculaire Environ 1/10 <sup>3</sup> (supérieure à celle du sérum)
<b>Zhao et al. 2013</b> <sup>58</sup>	Souris adultes	NP cœur fer, enveloppe de silice contenant de la FITC et fonctionnalisé ou nom par PEG + PAMAM	40 mg/kg	Injection intraveineuse unique Mesure à 24h.	Mesure de la concentration en Fe par ICP-MS.	Distribution testiculaire forte. Environ 1/10 <sup>2</sup> Légèrement supérieure pour les particules fonctionnalisées.
<b>Garcia et al. 2014</b> <sup>59</sup>	Souris adultes	NP d'argent fonctionnalisées avec du citrate de 10 nm	1 mg/kg	1 injection IV/3j Pendant 12 j (5 injections)	Mesure de la concentration en Ag par ICP-MS.	Distribution testiculaire Environ 1/10 <sup>5</sup>
<b>Meena et al.</b> <sup>60</sup>	Rats adultes	NP de dioxyde de Titane (TiO <sub>2</sub> ) de 10 à 20 nm	5 mg/kg 25 mg/kg 50 mg/kg	1 injection IV/s Pendant 4 semaines	Mesure de la concentration en Ti par ED-XRF.	Distribution testiculaire. Environ 1/10 <sup>4</sup> à 1/10 <sup>3</sup>
<b>Choi et al. 2015</b> <sup>61</sup>	Rats adultes	NP d'oxyde de zinc (ZnO) de 15 nm	30 mg/kg 3 mg/kg	Injection intraveineuse ou voie orale Injection unique	Mesure de la concentration en Zn par ICP-AES après minéralisation à l'acide.	Pas de distribution testiculaire quelque soit le dosage ou la voie d'administration

**TABEAU 3 : ETUDES SUR LA BIODISTRIBUTION TESTICULAIRE DES NANOPARTICULES. NP : NANOPARTICULES, NFS : NUMERATION FORMULE SANGUINE, ICP-MS : INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY, SAA : SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE, MET : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION, BHT : BARRIERE HEMATO-TESTICULAIRE, FITC : ISOTHIOCYANATE DE FLUORESCINE, ED-XRF : ENERGY DISPERSIVE X-RAY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY.**

Le premier point qui ressort à la lecture de ces différents articles est la confirmation par la majorité des publications de l'existence d'une distribution testiculaire des nanoparticules. Bien qu'on ne

puisse exclure un biais de publication, c'est-à-dire une propension de la communauté scientifique à ne publier que les résultats qui font état de cette distribution, il semble malgré tout légitime de dire que, dans un nombre important de situations, les nanoparticules sont capables d'atteindre le testicule chez les mammifères qui y sont exposés.

#### **4.5.1.1 QUANTIFICATION DE LA DISTRIBUTION TESTICULAIRE DES NANOPARTICULES**

Néanmoins, les conclusions des études divergent sur l'importance de cette distribution. Pour la majorité des auteurs, le testicule n'est pas un organe privilégié de la distribution des nanoparticules. Ainsi, Balasubramanian *et al.* montrent que pour une exposition par voie intraveineuse à des nanoparticules dont les concentrations sont proches de ce qui pourrait être obtenu chez des sujets travaillant dans un environnement exposé, les quantités de particules observées dans le testicule sont à la limite du seuil de détection et sont proportionnellement plutôt moins importantes que pour l'ensemble des autres organes<sup>49</sup>. De même, la majorité des autres études ayant réalisé des comparaisons avec les autres organes concluent également que le testicule n'est pas un organe privilégié de la biodistribution des nanoparticules<sup>44,47,50</sup>. L'étude de Choi *et al.* ne retrouve, quant à elle, aucune distribution testiculaire des nanoparticules d'oxyde de zinc injectée<sup>61</sup> ; toutefois dans cette étude les analyses ont été réalisées par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy), technique moins sensible que l'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) utilisée dans la majorité des autres études. Seules les études de Wang *et al.* et Kwon *et al.* concluent à une distribution prédominante vers le testicule, nous verrons toutefois dans la discussion que cette dernière étude qui détectait les nanoparticules par de la microscopie confocale n'a pas pris en compte l'autofluorescence testiculaire dans l'analyse de ses résultats, ce qui en limite grandement la portée.

Pour l'ensemble des études où cela était possible nous avons évalué la proportion de nanoparticules qui atteignent le testicule par rapport au nombre de particules injectées. Cette proportion se répartit entre une particule pour  $10^2$  et une pour  $10^7$  avec une moyenne autour de une pour  $10^5$ . Cette proportion est effectivement faible en comparaison d'organes tels que le foie ou les poumons<sup>44,49</sup>.

Si cette proportion est faible dans presque toutes les études, il n'en reste pas moins que les variations peuvent être importantes d'une étude à l'autre. De nombreux paramètres pourraient expliquer ces différences : le modèle animal utilisé, les caractéristiques physico-chimiques des particules (taille, forme, chimie de surface, tendance à l'agglomération), la voie et la durée d'exposition, jusqu'au diluant utilisé au moment de l'administration<sup>41</sup>. Ces paramètres ont été dans l'ensemble insuffisamment étudiés pour que des conclusions quant à leur impact sur la biodistribution testiculaire des nanoparticules puissent être tirées. Toutefois, parmi tous ces critères,

deux ont d'ores et déjà fait la preuve d'un effet : la taille des nanoparticules et les voies et durées d'exposition.

#### 4.5.1.2 TAILLE DES NANOPARTICULES

Il ressort de ces travaux que plus les particules sont petites et plus elles ont tendance à pénétrer facilement dans le testicule. Ainsi De Jong *et al.* montrent que seules les particules d'or de 10 nm sont capables d'atteindre le testicule après injection intraveineuse. Dans des conditions identiques, les particules d'or de 50 nm, 100 nm et 250 nm ne l'atteignent pas, ou dans des quantités inférieures au seuil de détection de la technique employée (ICP-MS)<sup>44</sup>. Toujours après une injection intraveineuse, Morishita *et al.* n'observent dans le testicule que les nanoparticules de silice ayant une taille de 70 nm, celles de 300 nm ne sont pas retrouvées<sup>51</sup>. Dans l'étude de Park *et al.*, après exposition par voie orale à des nanoparticules d'argent de 22 nm, 42 nm, 71 nm et 323 nm, de l'argent n'est détecté dans le testicule que pour les deux plus petites<sup>46</sup>. Cette différence n'est pas retrouvée de façon aussi nette dans l'étude de Lankveld *et al.* qui compare la distribution testiculaire de nanoparticules d'argent de 20 nm, 80 nm et 110 nm après injection intraveineuse, les trois nanoparticules étant retrouvées à des concentrations à peu près comparables<sup>47</sup>. Il en va de même dans l'étude de Geraets *et al.* pour des particules industrielles d'oxyde de Cérium auxquelles sont exposées des rats par voie inhalée malgré des tailles très différentes (de 10 nm à 5000 nm)<sup>50</sup>. Les auteurs avancent l'hypothèse que ceci est dû aux phénomènes d'agglomérations dont ils montrent que, pour ces particules industrielles, ils sont plus importants pour les particules de plus petite taille. La comparaison des études entre elles est plus délicate tant d'autres paramètres que la taille des nanoparticules est susceptible d'influer sur leur distribution testiculaire

#### 4.5.1.3 VOIE ET DUREE D'EXPOSITION

La majorité des études se sont intéressées à la voie intraveineuse probablement du fait de la facilité avec laquelle elle peut être mise en œuvre et de son intérêt dans l'évaluation des applications médicales des nanoparticules. Toutefois, peu d'études ont comparés différentes voies d'exposition entre elles.

La voie intra-péritonéale n'a été étudiée que par l'équipe de Kim *et al.* qui montre une distribution testiculaire de nanoparticules magnétiques fluorescentes de 50 nm mais comme nous le verrons ultérieurement, les conclusions de cette étude ne sont pas fiables.

La voie respiratoire n'a été étudiée que par deux équipes. L'équipe de Kwon *et al.* a montré qu'à la suite d'une exposition par voie inhalée, les nanoparticules se distribuaient en grande quantité dans le testicule, comparativement aux autres organes<sup>43</sup>. Toutefois, comme nous le verrons plus tard, les

auteurs n'ayant pas pris en compte l'autofluorescence testiculaire, il est difficile de tirer des conclusions de cette étude. Geraets *et al.*, quant eux constatent une distribution testiculaire relativement faible par rapport à d'autres organes après exposition par voie inhalée<sup>50</sup>.

L'exposition aux nanoparticules par voie intramusculaire n'a pas été étudiée.

L'exposition par voie intra-articulaire mimant la dégradation de prothèses métalliques et le rejet de débris dans le liquide articulaire n'a été étudiée que par Wang *et al.* qui montrent une distribution relativement importante du chrome et du cobalt constitutif des nanoparticules vers le testicule<sup>57</sup>. Le caractère chronique de l'exposition pourrait en partie être responsable des ces observations.

La majorité des études qui se sont intéressées à la biodistribution des nanoparticules après exposition par voie orale l'ont fait sur des durées d'exposition prolongées (de 14 jours à 90 jours), quatre d'entre elles ont utilisé des nanoparticules d'argent. De façon globale les résultats sont assez homogènes en termes de quantité d'argent atteignant le testicule. L'effet taille n'est étudié que dans deux études et n'est retrouvé que dans une seule des études<sup>46</sup>. Toutefois, deux des articles étudiés soumettent une théorie intéressante concernant un mécanisme possible de la biodistribution testiculaire des nanoparticules après exposition par voie orale. Dans l'étude de van der Zande *et al.* des rats sont exposés à des nanoparticules d'argent ou à de l'argent dissout sous la forme de nitrate d'argent pendant 28 jours<sup>52</sup>. Ils montrent qu'environ 7% de la dose de nanoparticules se solubilise et que seule cette fraction soluble est absorbée par l'estomac. L'argent s'accumule ensuite dans le testicule de façon plutôt abondante. Une analyse par SP ICP-MS (Single Particle ICP-MS) révèle la présence de particules dans la plus part des organes et notamment dans le testicule y compris chez les rats exposés à l'argent soluble. Ils émettent alors l'hypothèse que les particules ne sont pas absorbées telles qu'elles par l'estomac mais sont dissoutes et absorbées sous forme soluble. Elles ont ensuite la possibilité de se reformer à partir des éléments solubilisés. Dans l'étude de Lee *et al.* des nanoparticules d'argent de 10 nm et de 25 nm sont utilisés, les auteurs ne constatent toutefois pas d'effet taille<sup>53</sup>. Ils justifient ceci par l'hypothèse formulée par Zande *et al.*, à savoir une dissolution des nanoparticules dans l'estomac puis leur reconstitution dans l'organisme à partir des ions absorbés, s'appuyant ainsi sur les résultats de travaux d'autres auteurs<sup>62</sup>. Si cette hypothèse n'est pas évoquée dans les autres études, rien ne semble pour autant la contredire. Il est intéressant de noter que Choi *et al.* ne constatent ni distribution testiculaire ni distribution vers aucun autre organe de leurs nanoparticules de zinc et ce quelque soit le dosage considéré après exposition par voie orale<sup>61</sup>. Au contraire une augmentation de la concentration en zinc est observée dans le foie, la rate, les reins et les poumons, après exposition par voie intraveineuse. Cette étude est l'une des rares à avoir comparée deux voies d'exposition, elle montre clairement l'importance de celle-ci dans la

distribution des nanoparticules vers un certain nombre d'organes même si dans ce cas spécifique, le testicule ne semble pas concerné.

Concernant la durée d'exposition, deux études ont comparé l'impact d'expositions répétées par rapport à une exposition unique. L'étude de Geraets *et al.* constate que l'augmentation de la durée d'exposition par voie inhalée d'une journée à 28 jours favorise l'accumulation testiculaire de l'une des trois particules d'oxyde de cérium étudiées<sup>50</sup>. Bai *et al.* retrouvent des résultats similaires en comparant une injection unique de nanotubes de carbone par rapport à des injections répétées sur 5 jours<sup>48</sup>. Ainsi une exposition chronique pourrait favoriser l'accumulation de certaines nanoparticules dans le testicule. Il faut toutefois noter que dans les deux études les doses de nanoparticules utilisées à chaque jour d'exposition étaient les mêmes en exposition unique et en exposition répétée, ainsi la dose cumulative pour les expositions répétées était bien supérieure à celle des expositions uniques. Ce choix méthodologique pourrait à lui seul expliquer les différences constatées.

Bien que certaines hypothèses intéressantes concernant l'impact de la voie et de la durée d'exposition aux nanoparticules semblent émerger, de nouvelles études comparatives sont à mettre en œuvre pour définir leur effet réel sur la distribution testiculaire des nanoparticules.

#### **4.5.2 FRANCHISSEMENT DE LA BARRIERE HEMATO-TESTICULAIRE**

La barrière hémato-testiculaire constitue un obstacle naturel qui protège les cellules germinales des agressions extérieures en général et de celles du système immunitaire en particulier. Elle est principalement constituée des jonctions serrées qui relient entre elles les prolongements cytoplasmiques du pôle basal des cellules de Sertoli.

Comme ceci est représenté sur la Figure 6 toutes les cellules germinales ne sont pas protégées par la barrière hémato-testiculaire. En particulier, les spermatogonies, qui constituent les précurseurs des autres cellules germinales et qui sont responsables du maintien de la spermatogenèse tout au long de la vie, en sont exclues. Ainsi un toxique qui agirait directement sur ces cellules pourrait anéantir définitivement la production de gamètes sans avoir à franchir la barrière hémato-testiculaire. De plus, une toxicité sur les cellules de Sertoli ou de Leydig pourrait également inhiber la spermatogenèse de manière indirecte. Ainsi, la capacité ou non d'un facteur environnemental à franchir la barrière hémato-testiculaire ne présume en rien de sa toxicité sur la reproduction masculine. Toutefois, les cellules germinales en différenciation sont des cellules particulièrement vulnérables aux toxiques et il est indispensable de s'interroger sur la capacité des nanoparticules à franchir cette barrière hémato-testiculaire.



De nombreuses études tiennent pour un fait établi que les nanoparticules sont capables de franchir la barrière hémato-testiculaire. En réalité très peu d'études ont réellement tentées de montrer l'existence d'un tel franchissement. A notre connaissance, elles sont au nombre de quatre.

L'étude de Kim et al. est la première à avoir évoqué un franchissement de la barrière hémato-testiculaire en constatant une importante fluorescence adluminale au sein des tubes séminifères après injection intra-péritonéale de nanoparticules fluorescentes<sup>42</sup>. Toutefois, comme dans l'étude de Kwon et al., il n'a pas été tenu compte de l'autofluorescence testiculaire, ce qui, comme nous le verrons dans la discussion, rend caduque les conclusions proposées par cette étude.

L'étude de Morishita *et al.* s'intéresse à la biodistribution testiculaire de nanoparticules de silice de 70 nm injectées par voie intraveineuse<sup>51</sup>. Dans cette étude les observations sont réalisées en microscopie électronique à transmission et des nanoparticules sont retrouvées dans le cytoplasme et le noyau des spermatocytes, dans le cytoplasme des cellules de Sertoli et à proximité des spermatozoïdes. Il s'agit de l'étude apportant la meilleure preuve d'un franchissement de la barrière hémato-testiculaire comme en témoigne la présence de nanoparticules dans le cytoplasme des spermatocytes. En effet les spermatocytes se situent bien au-delà de la barrière. Il faut tout de même noter que les particules sont constituées de silice or le contraste de la silice n'est pas très élevé en microscopie électronique. Ainsi, à moins que les images présentées ne soient en réalité pas des images de particules, les conclusions de l'étude semblent plutôt robustes.

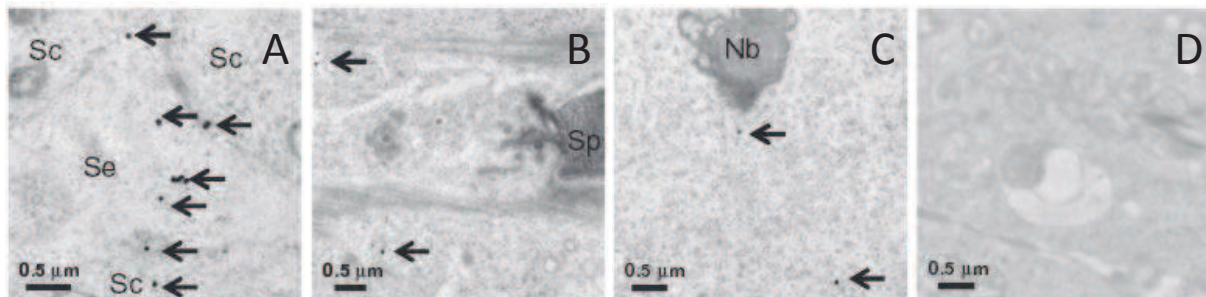


FIGURE 11 : IMAGES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION MONTRANT LA BIODISTRIBUTION TESTICULAIRE DES NANOPARTICULES DE SILICE DE 70 NM. LES FLECHES INDIQUENT LA PRESENCE DES PARTICULES DANS LES CELLULES DE SERTOLI ET LES SPERMATOCYTES (A), A PROXIMITE DES SPERMATOZOÏDES (B) ET DANS LES NOYAUX DES SPERMATOCYTES (C). SOURIS CONTROLE (D). SC : SPERMATOCYTE, SE : CELLULE DE SERTOLI, NB : NUCLEOLE. MORISHITA *ET AL.*

L'étude de Meena et al. présente des conclusions similaires en montrant par microscopie électronique que des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sont capables de pénétrer dans les spermatocytes après injections répétées par voie intraveineuse<sup>63</sup>. La présentation de l'étude manque toutefois de clarté et les images sont peu lisibles ce qui n'incite pas à la confiance dans les résultats présentés.

L'étude de Gao et al. vise à mesurer la biodistribution testiculaire et la reprotoxicité de particules de  $\text{TiO}_2$  de 294 nm administrées par voie orale chez la souris sur une période de 90 jours. La biodistribution est confirmée par le dosage du titane testiculaire en ICP-MS. Le franchissement de la barrière hémato-testiculaire est, quant à lui, attesté par l'observation en microscopie optique, d'agglomérats de particules dans les tubes séminifères dont la nature est confirmée par spectroscopie Raman (Figure 12). Plusieurs points sont à prendre en compte dans l'analyse de ces résultats. Tout d'abord, l'image de microscopie optique fournie montre un agglomérat de très grande taille dont la masse, s'il s'agissait de nanoparticules de dioxyde de titane, correspondrait à une proportion très importante des nanoparticules injectées. Il est donc à priori très peu probable qu'une telle accumulation ce soit produite dans cet unique tube séminifère et donc que l'image donnée corresponde réellement à un agglomérat de nanoparticules de dioxyde de titane. Ensuite la résolution en spectroscopie Raman est de façon générale relativement mauvaise, elle est classiquement donnée à 0,1 mol/l soit pour le dioxyde de titane : 8 mg/g. Ceci correspond à 25 000 fois la concentration retrouvée en ICP-MS. Pour être visible en Raman il faudrait que l'ensemble des particules soient concentrées dans un  $25000^{\text{ème}}$  du testicule. Ceci représenterait une répartition pour le moins inhomogène des nanoparticules au sein du testicule. Enfin que ce soit pour ce qui est de la distribution testiculaire des nanoparticules, comme de la toxicité de celles-ci sur la fonction de reproduction, l'équipe de Gao et al. présente des résultats en parfaite conformité avec les résultats attendus. C'est notamment le cas de l'altération des paramètres spermatiques (Tableau 4). De tels résultats font peser de sérieux doutes sur l'ensemble de l'étude. Il ne semble donc pas que les conclusions de cette étude puissent être retenues. Une seconde étude réalisée par la même équipe retrouve des résultats similaires<sup>64</sup>, toutefois les mêmes doutes méthodologiques et d'honnêteté scientifiques pèsent sur l'étude.

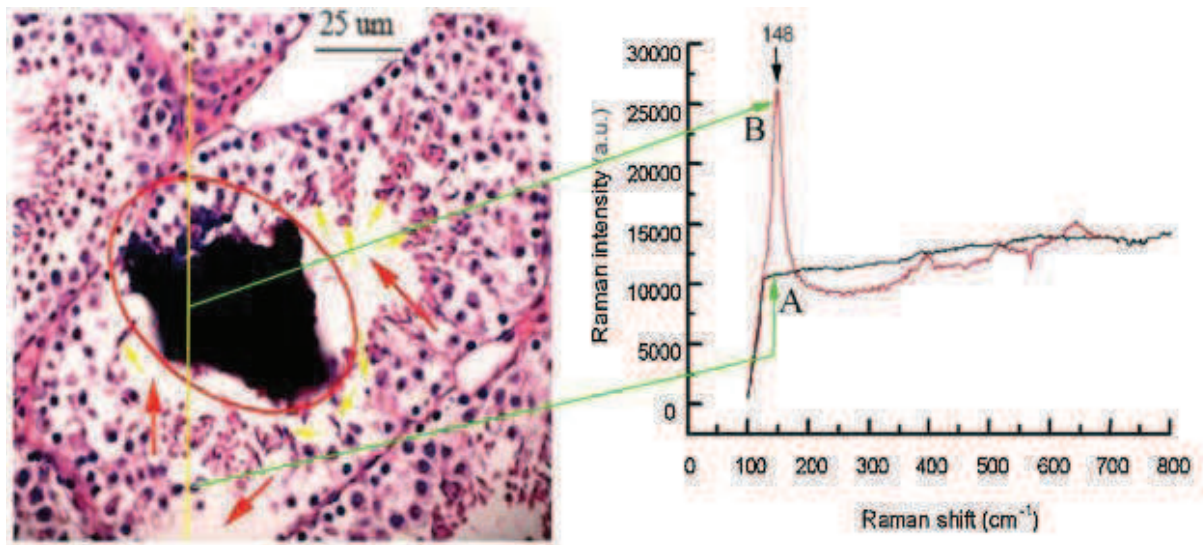


FIGURE 12 : IMAGE DE MICROSCOPIE OPTIQUE D'UN TESTICULE DE SOURIS EXPOSE A 10 MG/KG/J DE NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE, COUPLEE A UNE ANALYSE EN SPECTROSCOPIE RAMAN. GAO ET AL. <sup>62</sup>

**Table 3**

Total sperm concentration, sperm motility, and percentage of abnormal sperm after intragastric administration of TiO<sub>2</sub> NPs for 90 consecutive days.

Index	TiO <sub>2</sub> NPs (mg/kg BW)			
	0	2.5	5	10
Sperm concentration (× 10 <sup>6</sup> )	3.2 ± 0.16a	2.4 ± 0.12b	2.0 ± 0.1b	1.7 ± 0.085d
Motility rate of sperm(%)	92 ± 4.6a	85 ± 4.25b	70 ± 3.5c	55 ± 2.75d
Percentage of abnormal sperm(%)	2 ± 0.1a	9 ± 0.45b	12 ± 0.6c	23 ± 1.15d

Different letters indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ). Values represent mean ± SE (N = 10).

TABLEAU 4 : RESULTATS DES ANALYSES DE SPERME RETROUVES DANS L'ETUDE DE GAO ET AL. APRES EXPOSITION DE SOURIS A DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE. <sup>62</sup>

Enfin dans l'étude de Wang et al. il est dit à plusieurs reprises que les auteurs ont démontré un franchissement de la barrière hémato-testiculaire alors même que seule une analyse quantitative par ICP-MS sur un broyat de testicule a été réalisée. Cette méthodologie ne permet pas de conclure à un tel franchissement.

Au final, comme le souligne l'ANSES dans son rapport<sup>39</sup>, il est impossible de conclure à un franchissement de la barrière hémato-testiculaire par les nanoparticules sur les conclusions des études publiées jusqu'à maintenant. De nouvelles études mieux conduites doivent encore être réalisées.

### 4.5.3 BIOPERSISTANCE TESTICULAIRE DES NANOPARTICULES

Plusieurs des études listées dans le chapitre précédent se sont également attachées à évaluer la biopersistance des nanoparticules. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5.

Equipe	Modèle animal	Modèle de particules	Concentration des NP	Voie et durée d'exposition	Durée de suivi	Résultats
<b>Lankveld et al. 2010</b> <sup>47</sup>	Rats mâles adultes	NP d'argent. Taille 20 nm, 80 nm et 110 nm	20 nm : 23.8 µg/ml 80 nm : 26.4 µg/ml 110 nm : 27.6 µg/ml.	Voie intraveineuse. 1 injection/j pendant 5 j	17 jours	Concentration testiculaire maximale à J6, diminue rapidement jusqu'à J11 pour être presque nulle à J17 pour les 20 et 80 nm. Elle se maintient légèrement pour les 110 nm
<b>Geraets et al. 2012</b> <sup>50</sup>	Rats mâles adultes	NP d'oxyde de cérium. Taille fournisseur : 5-10 nm, 40 nm et 5000 nm	Dose totale estimée : 5000 nm : 4.24 mg 40 nm : 1.54 mg 5-10 nm : 0.83 mg	Inhalation : 6h/j pendant 1j ou 28j.	72h (48h pour les 5-10 nm) après l'exposition	La concentration en NP se maintient entre la fin de l'exposition et la fin de la période de suivi (72h ou 48h)
<b>Van der Zande et al. 2012</b> <sup>52</sup>	Rats mâles adultes	NP d'argent ou AgNO <sub>3</sub> . Taille : 15 fonctionnalisées par du polyvinylpyrrolidone et 20 nm non fonctionnalisées.	NP : 90 mg/kg AgNO <sub>3</sub> : 9 mg/kg	Voie orale 4 semaines	84 jours	Maintient très prolongé des particules de 20 nm et de l'argent soluble dans le testicule. Maintient de l'ensemble dans le cerveau.
<b>Lee et al. 2013</b> <sup>53</sup>	Rats adultes	NP d'argent : Taille : 10 nm, 25 nm.	100 mg/kg/j 500 mg/kg/j	Voie orale 4 semaines	4 mois	Maintient des concentrations testiculaires d'argent à des taux élevés pour les deux types de particules (résultats identiques pour le cerveau)
<b>Lee et al. 2013</b> <sup>55</sup>	Lapins	NP d'argent recouvertes de citrate	5 mg/kg 0.5 mg/kg (soit 12 mg)	Injection intraveineuse unique	28 J	Maintient d'une concentration relativement élevée à 28j pour la dose la plus élevée mais forte diminution pour la dose la plus basse. Excrétion biliaire prédominante.
<b>Garcia et al. 2014</b> <sup>59</sup>	Souris adultes	NP d'argent de 10 nm fonctionnalisées avec du citrate	1mg/kg	1 injection IV/3j Pendant 12 j (5 injections)	120 jours	Distribution testiculaire maximale à J15 puis lente diminution jusqu'à J120 ou 1/3 des particules présentes à J15 sont encore retrouvées.

TABLEAU 5 : ETUDES SUR LA BIOPERSISTANCE TESTICULAIRE DES NANOPARTICULES

L'étude de Geraets *et al.* montre une biopersistance des trois nanoparticules d'oxyde de cérium à des concentrations équivalentes à ce qui est constaté à la fin de la période d'exposition<sup>50</sup>. Toutefois

le suivi n'ayant été réalisé que sur 48 ou 72 heures, il est difficile de tirer des conclusions de cette étude.

Les autres études s'étant toutes intéressées à des nanoparticules d'argent la comparaison de leurs résultats est particulièrement pertinente. Ainsi l'étude de Lankveld *et al.* révèle une diminution relativement rapide de la concentration testiculaire des différentes particules avec un léger maintien des particules les plus grandes (110 nm)<sup>47</sup>. Les études de van der Zande *et al.* et de Lee *et al.* retrouvent une forte biopersistence de l'argent dans le testicule respectivement de 2 mois et de 4 mois après la fin de l'exposition<sup>52,53</sup>. L'étude de Garcia *et al.* retrouve une biopersistence plus faible puisqu'un tiers seulement des nanoparticules d'argent sont encore présentes quatre mois après l'exposition quelque soit la dose considérée<sup>59</sup>. L'étude de Lee *et al.* (lapin) présente également une biopersistence plus faible avec une diminution d'un tiers de la dose à 28 j pour la dose d'exposition la plus élevée et une diminution des trois quarts pour la dose la plus faible. La principale différence qui existe entre ces études est la voie d'exposition. Pour les études de Lankveld *et al.*, Lee *et al.* (lapin) et Garcia *et al.* il s'agit d'injections par voie intraveineuse, pour les deux autres, c'est une exposition par voie orale. Une explication possible de l'impact de la voie orale sur cette biopersistence est donnée par l'hypothèse défendue plus haut selon laquelle les particules d'argent exposées à l'acidité gastrique seraient dissoutes et transportées jusqu'au testicule sous forme soluble, là elles pénétreraient plus facilement les compartiments protégés de ce dernier pour reformer ensuite de nouvelles particules. Un tel mécanisme leur permettrait d'accroître de façon importante leur biopersistence.

Il est à noter également que dans les études de Zande *et al.* et de Lee *et al.* l'autre organe qui présente une très forte biopersistence de l'argent est le cerveau. Les auteurs expliquent que ceci est probablement lié à la présence d'une barrière naturelle au sein de ces deux organes qui diminue la vitesse d'élimination des particules. Une telle explication n'est toutefois valable que si l'on considère que les nanoparticules ont réellement franchi ces barrières, ce qui comme nous l'avons vu précédemment, n'est pas clairement démontré pour la barrière hémato-testiculaire.

En conclusion, la biopersistence des nanoparticules est probablement liée à la composition chimique de celles-ci et à la voie d'exposition. Elle semble être supérieure dans le testicule par rapport aux autres organes ce qui pourrait être en lien avec la présence de la barrière hémato-testiculaire. Néanmoins les données sont encore insuffisantes pour comprendre l'ensemble des paramètres en jeu et d'autres études s'avèreront nécessaires.

#### 4.5.4 BIOTOXICITE TESTICULAIRE DES NANOPARTICULES

Du fait de la multiplication des sources d'exposition aux nanoparticules, leur toxicité sur la reproduction humaine est de plus en plus étudiée, comme en atteste le grand nombre de revues de la littérature traitant ce sujet<sup>31,65-70</sup>.

##### 4.5.4.1 MODELE CELLULAIRE

Plusieurs travaux ont étudié cette toxicité sur des modèles cellulaires. Toutefois leur nombre étant restreint et les modèles cellulaires comme particuliers étant très différents, il est difficile de faire une synthèse pertinente de ces travaux sans les décrire un par un.

L'étude de Braydich-Stolle *et al.* prend pour modèle une lignée cellulaire appelée C18-4 dont la particularité est de se rapprocher fortement des cellules souches spermatogoniales<sup>71</sup>. Ils l'exposent à trois types de nanoparticules : argent (15 nm), aluminium (30 nm) et molybdène (30 nm) ainsi qu'aux éléments constitutifs de ces particules sous forme dissouts. Les trois s'avèrent être toxiques à haute concentration et ce quel que soit le paramètre étudié : fonction mitochondriale, relargage de Lactate DésHydrogénase (LDH), pourcentage de cellules apoptotiques ou nécrotiques. Toutefois la concentration en nanoparticules nécessaire pour observer ces phénomènes varie d'une nanoparticule à l'autre. Par exemple, les nanoparticules d'argent entraînent une diminution importante de la fonction mitochondriale dès 10 µg/ml alors qu'il faut atteindre 50 µg/ml pour observer un effet significatif des nanoparticules de molybdène sur cette même fonction. De façon générale, les nanoparticules d'argent semblent plus toxiques que les deux autres. Cette différence pourrait être due à un effet de la composition chimique ou de taille : 15 nm pour les nanoparticules d'argent, 30 nm pour celles de molybdène ou d'aluminium. Ces dernières ont quant à elles aussi montré une forte propension à s'agréger dans le cytoplasme des cellules, sans toutefois atteindre le noyau ni montrer une toxicité plus importante que les nanoparticules de molybdène. Enfin, en comparant la toxicité des particules à une dose équivalente de leurs éléments constitutifs sous forme solubles, cette étude fait un autre constat très important : la forme nanoparticulaire d'un élément présente toujours une toxicité cellulaire supérieure à sa forme soluble quel que soit la fonction cellulaire considérée et ce pour les trois particules étudiées.

La même équipe a publié un second papier quelques années plus tard en s'intéressant plus spécifiquement aux nanoparticules d'argent. Pour ce faire ils ont reproduit la même étude avec trois tailles de nanoparticules différentes (10 nm, 25 nm et 80 nm) et deux fonctionnalisations de surface différentes (carbohydate et polysaccharides). Ils ont constaté une forte internalisation des particules



et une réduction importante de la prolifération cellulaire en présence des nanoparticules d'argent pour les particules les plus petites (10 et 25 nm). Cette prolifération réduite ne semblait pas provenir d'une augmentation de la production de radicaux libres ou de morts cellulaires accrues. Les particules d'argent semblaient d'avantage interférer avec les voies de signalisations intervenant dans le cycle cellulaire : en particulier sur la voie du GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor) par inhibition d'une kinase (Fyn kinase) aboutissant à une inhibition de l'expression de c-myc, gène fortement impliqué dans la prolifération cellulaire<sup>72</sup> (Figure 13).

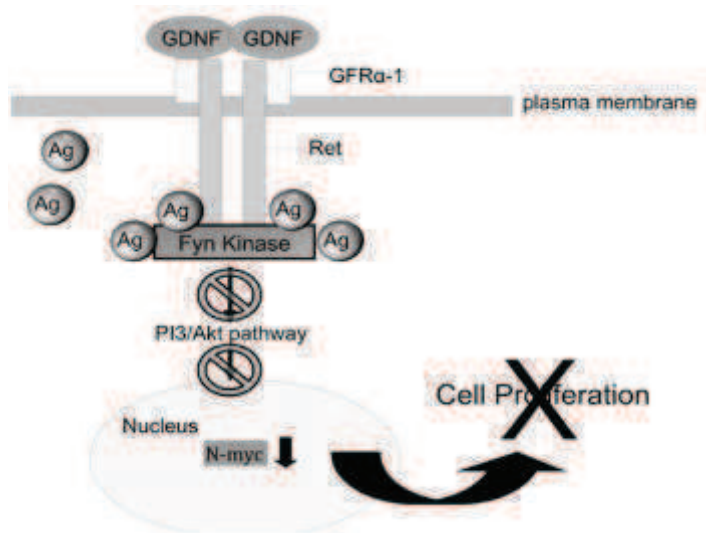


FIGURE 13 : SCHEMA PRESENTANT UN MECANISME POSSIBLE D'INHIBITION DE LA PROLIFERATION D'UNE LIGNEE DE CELLULES SOUCHES SPERMATOGONIALES PAR LES NANOPARTICULES D'ARGENT. BRAYDICHE-STOLLE ET AL.

L'équipe de Komatsu *et al.* s'est plutôt orientée sur l'exploration de la fonction endocrine du testicule en travaillant sur un modèle de cellules de Leydig<sup>73</sup>. Ils ont étudié trois types de nanoparticules : dioxyde de titane (25-70 nm), particules de moteur diesel, et noir de carbone (14 nm). Ils notent tout d'abord une accumulation et une agglomération des trois types de nanoparticules au sein du cytoplasme cellulaire sans atteinte du noyau. Le mécanisme suspecté est celui d'une endocytose des nanoparticules par les cellules de Leydig. En outre, une mort cellulaire accrue, ainsi qu'une limitation de la prolifération des cellules est observée pour des concentrations élevées de nanoparticules. Le point le plus intéressant est peut-être la variation induite dans l'expression des gènes. Le gène de l'Hème-Oxygénase 1, antioxydant endogène, est surexprimé en présence de 30 µg/ml de particules diesel par rapport au contrôle, ce qui laisse penser que la toxicité des particules diesels se fait au moins partiellement par la production de radicaux libres. Cette surexpression n'étant pas retrouvée pour les deux autres types de particules, il doit exister une autre voie de toxicité de ces nanoparticules. Le gène de la protéine régulatrice de la stéroïdogénèse (StAR), protéine coupant la chaîne latérale du cholestérol et stimulant ainsi la synthèse de testostérone, est surexprimée pour de



très faibles concentrations de particules diesels (30 µg/ml) ou de particules de noir de carbone (10µg/ml). Ceci semble indiquer que certaines nanoparticules pourraient entraîner une altération de la stéroïdogénèse.

L'article d'Asare *et al.* s'est attaché à mesurer la toxicité des nanoparticules d'argent (20 nm et 200 nm) et de dioxyde de titane (20 nm) sur des cultures de cellules testiculaires de souris et sur cellules carcinomateuses de testicule embryonnaire<sup>74</sup>. Pour ce faire ils ont mesuré la division cellulaire, l'activité mitochondriale, la nécrose et l'apoptose des cellules et la fragmentation de l'ADN par test COMET. Les nanoparticules de dioxyde de titane entraînent une prolifération des cellules de souris ainsi qu'une hausse de leur métabolisme tandis que les nanoparticules d'argent, quel que soit leur taille, ont tendance à provoquer l'apoptose et la nécrose des cellules et à diminuer le métabolisme des cellules carcinomateuses humaines. La fragmentation de l'ADN n'était significativement augmentée dans aucune situation même si une tendance était observable pour les cellules carcinomateuses humaines exposées aux particules d'argent de 200 nm. Les auteurs concluent qu'aussi bien la composition chimique des nanoparticules que le type de cellules exposées sont déterminants dans l'évaluation de leur toxicité potentielle.

On retient de ces premières études que la dose toxique la plus faible constatée par les auteurs est d'environ 10 µg/ml. Si on extrapole aux études de biodistribution précédemment décrites, avec toutes les imperfections qu'une telle démarche comporte, pour une souris dont le testicule fait environ 100 mg, cela correspondrait à une concentration testiculaire de 2 µg. Soit, suivant les résultats des études de biodistribution, à une exposition totale à des doses comprises entre 2 mg et 20 g pour une souris. De telles doses ne sont envisageables que s'il existe une exposition très prolongée avec une forte accumulation testiculaire. Ainsi, comme le souligne l'ANSES<sup>39</sup>, si ces études sur modèle cellulaire apportent des indices sur les mécanismes d'une reprotoxicité potentielle des nanoparticules, les concentrations choisies sont peu réalistes au regard de leur faible biodistribution.

#### **4.5.4.2 MODELE DE SPERMATOZOÏDE MATURE**

Plusieurs études se sont intéressées à l'action des nanoparticules sur des spermatozoïdes matures. Le manque de standardisation les rend difficilement comparables et explique, au moins en partie, leurs résultats contradictoires. De plus des choix méthodologiques discutables et un manque de clarté dans l'exposé des résultats limitent la portée de plusieurs d'entre elles.

C'est particulièrement le cas de l'étude de Wiwanitkit *et al.* qui constate une accumulation des nanoparticules d'or au sein des spermatozoïdes, et met en évidence une « fragmentation des spermatozoïdes » et une diminution de leur mobilité<sup>75</sup>. Il faut toutefois rester très prudent

concernant les résultats de cette étude. Elle a été réalisée sur le sperme d'un unique patient et seule la microscopie optique standard sur sperme frais a été utilisée pour évaluer l'impact des nanoparticules. De surcroît, la taille des nanoparticules utilisées n'est pas précisée, mais en l'absence d'images de qualité, il est difficile d'imaginer qu'elles soient visibles en microscopie standard à moins d'importants phénomènes d'agglomérations, ce dont les auteurs ne font pas mention. Il est également difficile de comprendre la réalité que recouvre le terme de « fragmentation des spermatozoïdes », aucune étude de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (type technique TUNEL ou COMET) n'ayant été réalisée, il s'agit probablement d'une simple altération de leur forme. Enfin, la diminution de la mobilité rapportée correspond en réalité à un nombre de formes mobiles évalué à 75 % dans la fraction de sperme exposée aux nanoparticules contre 95 % dans la fraction contrôle, ce qui dans les deux cas reste supérieure à la normale : 40 % de formes mobiles (OMS 2010).

L'étude de Barkhordari *et al.* est elle aussi sujette à caution du fait d'un choix méthodologique discutable dans l'évaluation de la survie de spermatozoïdes (test MTT) et dans les doses de nanoparticules choisies : de 10 à 1000 µg/ml de nanoparticules d'oxyde de zinc de 30 à 70 nm<sup>76</sup>. Une diminution de la survie des spermatozoïdes est néanmoins observée pour les doses les plus élevées (à partir de 500 µg/ml ou 100 µg/ml pour des expositions de plus de 3h).

L'étude de Moretti *et al.* retrouve également une diminution de la mobilité et de la vitalité de spermatozoïdes humains après exposition d'une heure à des nanoparticules d'or (50 nm) et d'argent (65 nm)<sup>77</sup>. Mais là encore ces observations sont réalisées uniquement pour des doses très élevées de nanoparticules (à partir de 125 µM) peu réalistes *in vivo*. Il est à noter qu'une internalisation des nanoparticules d'or par les spermatozoïdes est observée en microscopie optique, ce qui n'est pas le cas pour celles d'argent. L'hypothèse la plus probable pour expliquer la toxicité des nanoparticules d'argent est une action indirecte par l'intermédiaire des ions argents détachées des particules<sup>78</sup>

L'étude de Makhluף *et al.* constate, quant à elle, une accumulation spontanée de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer recouvertes de polyvinylalcool, tout d'abord contre la membrane plasmique (de façon rapide : 20 min) puis au sein de la cellule<sup>79</sup>. Une fois dans la cellule, environ deux particules sur cinq restent sous forme libre tandis que les autres se lient à différents organites tels que les mitochondries ou l'acrosome. Toutefois, même après 4 heures d'incubation, la mobilité des spermatozoïdes et leur capacité à initier une réaction acrosomique ne semblent pas altérées.

Contrairement à plusieurs études citées précédemment, l'étude de Taylor *et al.* est très bien réalisée<sup>80</sup>. Elle s'intéresse à la toxicité des nanoparticules d'or. Celles-ci sont fonctionnalisées (7 nm, faible agglomération) ou non (10 nm mais forte agglomération) et mises en contact de

spermatozoïdes de taureaux. Elle montre que les nanoparticules se fixent à la surface des spermatozoïdes, recouvrant les fonctions thiols des ces derniers et entraînant une réduction de leur mobilité. En revanche, elles n'entraînent pas d'augmentation de la production de radicaux libres, ne pénètrent pas dans le cytoplasme des spermatozoïdes et n'entraînent pas d'altération de leur morphologie. Les auteurs ont également montré une diminution du pouvoir fécondant des spermatozoïdes exposés aux nanoparticules non fonctionnalisés, ceci est probablement lié à l'encombrement stérique créé par les agglomérats importants de ces particules. En conclusion de cette étude il faut noter que tous ces effets sont observés pour une dose relativement importante de particules (10 µg/ml soit 14000 particules par spermatozoïdes) dont il est assez peu probable qu'elle soit atteinte *in vivo*. Une étude très similaire réalisée par Tiedemann et al. a retrouvé des résultats identiques après exposition de spermatozoïdes de sanglier à des nanoparticules d'or et d'argent. Ils n'observaient qu'un faible accrochage membranaire et pas de pénétration intracytoplasmique des particules. Les auteurs ne retrouvent pas non plus d'altération membranaire ni de baisse de la mobilité.

Enfin, l'étude de Gopalan *et al.* est la seule qui ait étudié l'impact des nanoparticules, en l'occurrence d'oxyde de zinc et de dioxyde de titane de 40 à 70 nm, sur la fragmentation de l'ADN spermatique. Ils ont montrés une augmentation de cette dernière pour des doses respectives de 46,2 µg/ml et de 3,8 µg/ml.

Au final, les études les plus sérieuses réalisées sur un modèle de spermatozoïde mature ne retrouvent pas d'altération de la fonction des spermatozoïdes pour des concentrations réalistes de nanoparticules. De façon générale, il est légitime de s'interroger sur la pertinence d'un modèle de spermatozoïdes matures dans l'optique d'une étude de toxicité sur la fertilité. En effet, le spermatozoïde est une cellule quiescente dont l'ADN est protégé par un système de compaction spécifique. Il est donc vraisemblable de penser que sa résistance aux agents physiques ou chimiques est relativement élevée. Il faut ajouter à cela que le temps d'exposition d'un spermatozoïde aux nanoparticules, du fait de sa faible durée de vie, est limité par rapport à celui des autres cellules du testicule. De plus les spermatozoïdes sont protégés par la barrière hémato-testiculaire or nous avons vu qu'il n'était pas encore clairement prouvé que les nanoparticules étaient capables de la franchir. Pour toutes ces raisons, les études sur lignée de cellules testiculaires devraient être privilégiées aux études sur spermatozoïdes matures.

#### **4.5.4.3 ATTEINTES HISTOLOGIQUES**

Plusieurs études se sont intéressées à l'évaluation des lésions du parenchyme testiculaire après exposition aux nanoparticules. La majeure partie d'entre elles a tout d'abord mesuré l'évolution du

poids testiculaire<sup>48,54,57,59,61,81-88</sup>. Il a ainsi été montré que quel que soit le modèle animal (rats, souris), les particules considérées (argent, nanotubes de carbone, noir de carbone, dioxyde de titane, oxyde de zinc, chrome-cobalt), et les voies d'exposition (intraveineuse, inhalée, prénatale, orale, intra-articulaire), les nanoparticules ne semblent pas affecter le poids testiculaire. L'étude de Li *et al.* constate en revanche que l'exposition de souris gestantes à des gaz d'échappement de moteur diesel non filtré (présence de particules diesels) ou filtrées (absence de particules diesel) entraîne dans les deux cas une diminution de la masse de la prostate et des vésicules séminales chez les petits<sup>82</sup>. Il est toutefois probable que cet effet soit d'avantage lié aux hydrocarbures présents dans les deux groupes qu'aux particules présentes uniquement dans le groupe « non filtré ». La seule étude en contradiction avec ces résultats est celle de Gao *et al.* qui montre que l'exposition de souris à des nanoparticules de dioxyde de titane de 294 nm pendant 90 jours entraîne une diminution du poids testiculaire<sup>54</sup>. Ces résultats sont toutefois à prendre avec beaucoup de précautions puisque nous avons vu dans le chapitre précédent les nombreuses incertitudes qui pesaient sur cette étude.

En entrant dans le détail des anomalies retrouvées, nous notons tout d'abord que l'étude de Chen *et al.*, qui s'est intéressée à l'impact de nanoparticules d'or pégyliées injectées à des souris par voie intra-péritonéale à la dose de 4mg/kg, ne retrouve aucune altération de l'histologie testiculaire<sup>89</sup>. Il en va de même pour l'étude de Xu *et al.* qui ne constate pas d'anomalie testiculaire particulière après cinq injections intraveineuse de 20 mg/kg de nanoparticules de silice de 63 nm sur 13 jours chez la souris<sup>86</sup>. L'étude ultra-structurale des cellules testiculaires montre toutefois de petites anomalies de la membrane interne des mitochondries réversibles au soixantième jour. L'étude de Choi *et al.* ne retrouve, elle non plus, aucune anomalie histologique du testicule après exposition à des nanoparticules de dioxyde de titane de 15 nm aux doses de 3 mg/kg et 30 mg/kg et ce que ce soit après injection unique par voie intraveineuse ou exposition orale<sup>61</sup>. Ce résultat est confirmé par l'étude de Tassinari *et al.* avec des particules un peu plus grandes (environ 45 nm)<sup>88</sup>. A l'inverse, l'étude de Jia *et al.* qui expose également des souris à des nanoparticules de dioxyde de titane par voie orale mais pendant 42 jours observe l'apparition de vacuoles dans l'épithélium séminifère à partir de 50 mg/kg/j. De même l'étude de Meena *et al.* retrouve des anomalies discrètes après exposition par voie intraveineuse à des particules similaires<sup>60</sup>.

L'étude de Yoshida *et al.* montre que l'inhalation de particules de noir de carbone de 14 à 95 nm à la dose de 0,1 mg/j pendant 7 jours par des souris entraîne une dégénérescence de certains tubes séminifères (Figure 14), ce résultat n'est pas observé pour des doses plus faibles<sup>81</sup>.

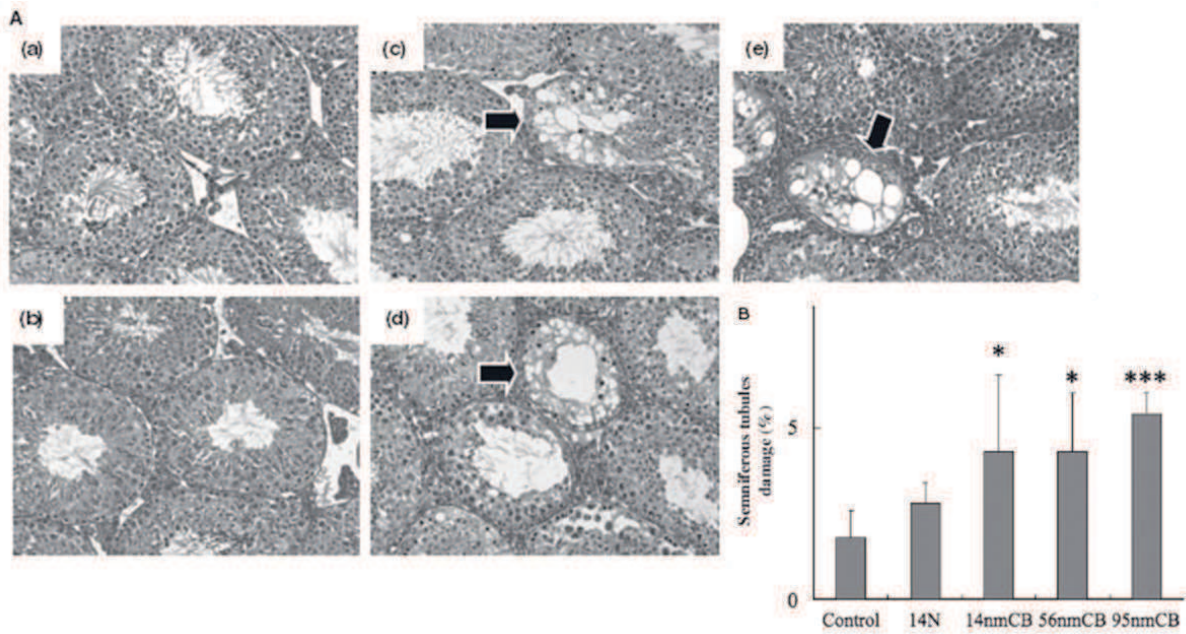


FIGURE 14 : A. COUPES DE TESTICULES DE SOURIS EXPOSEES AUX PARTICULES DE NOIR DE CARBONE OBSERVEES EN MICROSCOPIE OPTIQUE X 200 (A) SOURIS CONTROLE, (B) 14 NM FAIBLE DOSE, (C) 14 NM FORTE DOSE (0,1 MG/J SUR 7J), (D) 56 NM FORTE DOSE, (E) 95 NM FORTE DOSE. LES FLECHES INDIQUENT LES ZONES DE DEGENERESCENCE. B. POURCENTAGE DE TUBES SEMINIFERES EN DEGENERESCENCE, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  EN COMPARAISON DU GROUPE CONTROLE. YOSHIDA *ET AL.*

L'étude de Bai *et al.* révèle, chez la souris, après injections de nanotubes de carbone par voie intraveineuse, une réduction de l'épaisseur de l'épithélium germinatif, une réduction du nombre de spermatogonies, une nécrose et une réduction du nombre de cellules de Sertoli (Figure 15)<sup>48</sup>. Ces altérations sont essentiellement observées après des injections répétées de nanotubes. Elles sont pour l'essentiel spontanément résolutive 60 jours après l'arrêt des injections.



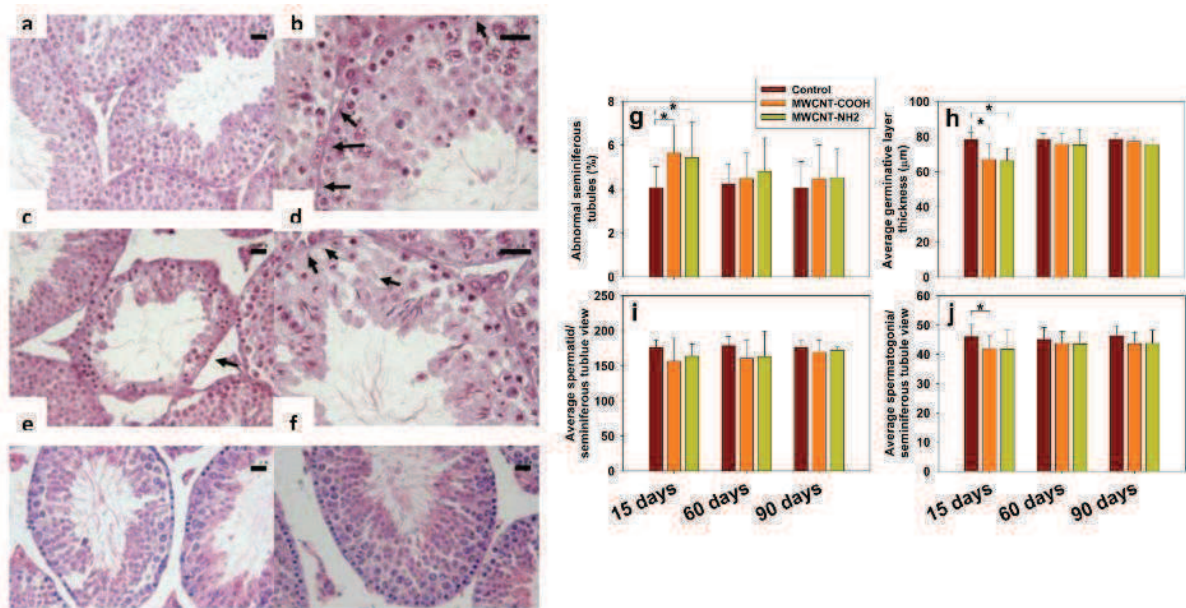


FIGURE 15 : COUPES DE TESTICULES DE SOURIS EXPOSEES AUX NANOTUBES DE CARBONE OBSERVEES EN MICROSCOPIE OPTIQUE. (A) ET (B) SOURIS CONTROLES ; (C) ET (D) SOURIS EXPOSEES A DES INJECTIONS REPETEES DE NANOTUBES DE CARBONE A J15 ; (E) IDEM A J60 ; (F) IDEM A J90. (G) POURCENTAGE DE TUBES SEMINIFERES ANORMAUX ; (H) EPAISSEUR MOYENNE DE L'EPITHELIUM GERMINATIF ; (I) NOMBRE MOYEN DE SPERMATIDES PAR TUBE ; NOMBRE MOYEN DE SPERMATOGONIES PAR TUBE. ROUGE : GROUPE CONTROLE, JAUNE : NANOTUBES FONCTIONNALISES AVEC DES GROUPEMENTS CARBOXYLES, VERT : NANOTUBES FONCTIONNALISES AVEC DES GROUPEMENTS AMINES, \* P < 0,05 PAR RAPPORT AU GROUPE CONTROLE. BAI ET AL.

L'étude de Gromadzka-Ostrowska *et al.* constate que l'injection intraveineuse de nanoparticules d'argent de 200 nm à la dose de 5 mg/kg à des rats mâles entraîne une augmentation modérée mais significative du diamètre des tubes séminifères et un élargissement des espaces intercellulaires avec l'apparition de vacuoles au sein des tubes. Ces anomalies ne sont pas retrouvées pour l'injection de nanoparticules de 20 nm aux doses de 5 et 10 mg/kg<sup>83</sup>. Après quinze jours d'exposition à des nanoparticules d'argent nettement plus petites (10 nm) à la dose de 1 mg/kg/3j par voie intraveineuse chez la souris, l'étude de Garcia *et al.* retrouve des images assez similaires (Figure 16) :

- Une augmentation du diamètre des tubes séminifères et de leur lumière ainsi qu'une diminution de l'épaisseur de l'épithélium séminifère
- Une augmentation du nombre de cellules germinales en apoptose
- Une augmentation du volume cytoplasmique et nucléaire des cellules de Leydig.

Selon les auteurs, l'ensemble de ces anomalies, en dehors de l'augmentation du volume du noyau des cellules de Leydig, sont réversibles au 120<sup>ème</sup> jour qui suit le début de l'exposition. Enfin, toujours dans le cadre d'exposition de rats mâles à des nanoparticules d'argent (70 nm) par voie orale (25 à 200 mg/kg/12h pendant 48 jours), l'étude de Miresmaeili *et al.* constate des résultats similaires avec une diminution du nombre de cellules germinales et l'apparition de zones de clivages dans les tubes

séminifères<sup>90</sup>. Il faut toutefois noter que cette étude est peu claire dans la présentation de ses résultats et que les doses étudiées sont particulièrement importantes.

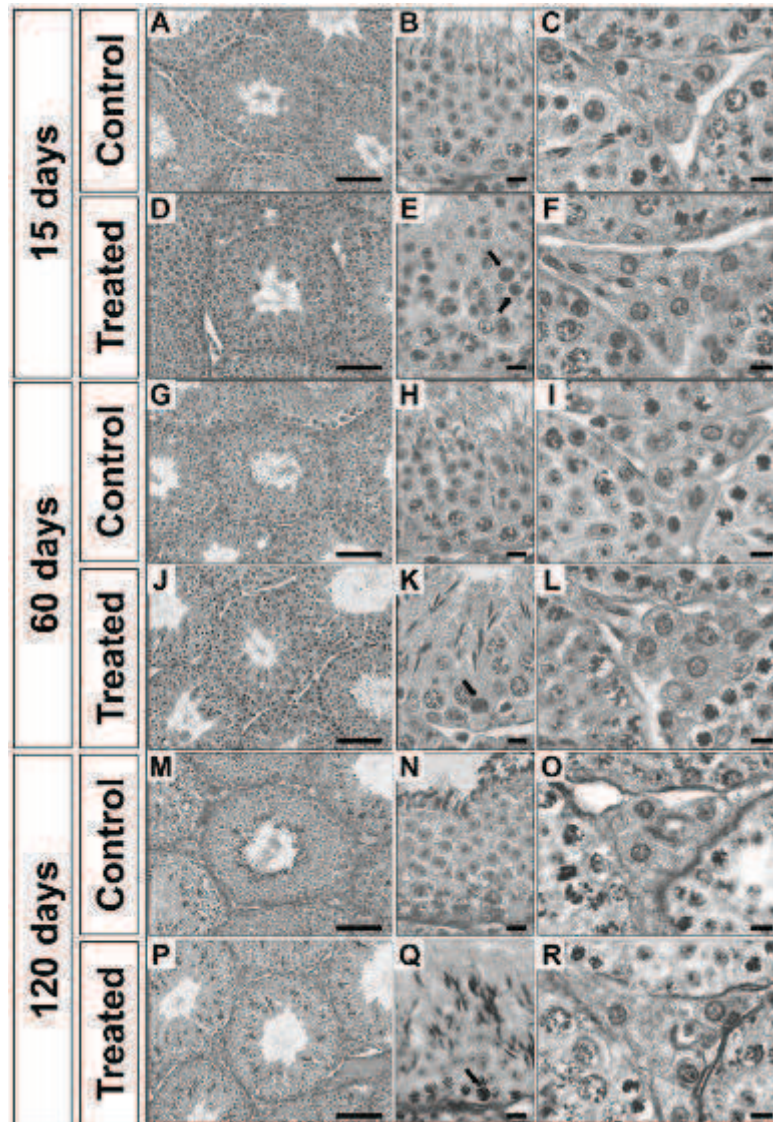


FIGURE 16 : COUPES DE TESTICULES DE SOURIS EXPOSEES AUX NANOPARTICULES D'ARGENT PENDANT 15 JOURS A LA DOSE D'1 MG/KG/3J OBSERVEES EN MICROSCOPIE OPTIQUE A 15 JOURS, 60 JOURS ET 120 JOURS APRES LE DEBUT DE L'EXPOSITION. LES FLECHES EN E, K ET Q INDIQUENT LES CELLULES GERMINALES EN APOPTOSE. GARCIA *ET AL.*

L'étude de Li *et al.* retrouve une diminution du nombre de cellules germinales dans les groupes de souris dont les mères ont été exposées au gaz d'échappement de moteur diesel, qu'il soit filtré ou non, ce qui rend difficile la mise en évidence de la part réellement liée à la toxicité des nanoparticules dans ce résultat (Figure 17 A-C)<sup>82</sup>.

L'étude de Wang *et al.* retrouve une désorganisation modérée de l'épithélium séminifère après injection intra-articulaire de nanoparticules de chrome-cobalt pendant 10 semaines et ce seulement pour la dose la plus élevée (500 µg/kg/sem.)<sup>57</sup>.



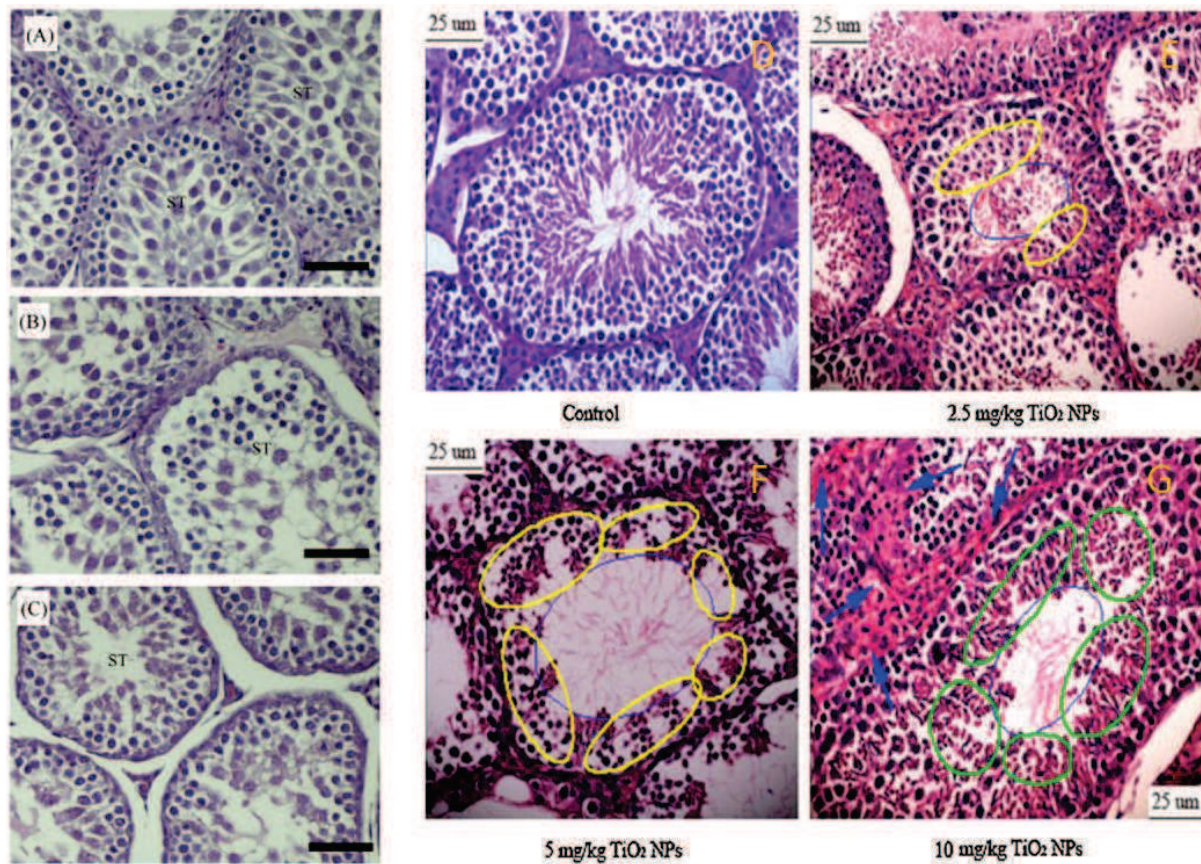


FIGURE 17 : COUPES DE TESTICULES DE SOURIS OBSERVEES EN MICROSCOPIE OPTIQUE. A A C : ECHELLES : 50  $\mu$ m ST : TUBES SEMINIFERES LI ET AL. (A) SOURIS CONTROLES NEES DE MERES NON EXPOSEES ; (B) SOURIS NEES DE MERES EXPOSEES AU GAZ DIESEL NON FILTRE ; (C) SOURIS DE MERES EXPOSEES AU GAZ DIESEL FILTRE. D A G : SOURIS EXPOSEES A DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE PAR VOIE ORALE PENDANT 90 J. GAO ET AL. CERCLE BLEU : RAREFACTION DES SPERMATOZOÏDES, CERCLE JAUNE : RAREFACTION DES CELLULES EPITHELIALES, CERCLE VERT : NECROSE LIEE AU DEFICIT EN TESTOSTERONE, FLECHE BLEU : CONGESTION DES ESPACES INTER-TUBULAIRES.

Enfin les études de Gao *et al.* et Zhao *et al.* d'une part et celles de Hassankhani *et al.* constatent des anomalies histologiques nombreuses : raréfaction, réarrangement et apoptose des cellules de Sertoli et de Leydig, diminution de l'épaisseur de l'épithélium séminifère, diminution du nombre de cellules germinales et vacuolisations de l'épithélium (Figure 17 D-G) pour les premières<sup>54,64</sup> et congestion, altération de la spermatogenèse et œdème testiculaire (Figure 18) pour la seconde<sup>91</sup>. Dans ces trois études réalisées chez la souris ou le rat après injection de nanoparticules de dioxyde de titane ou de silice, les images présentées ne montrent pas des anomalies aussi importantes. Les résultats de ces études sont donc sujets à caution.



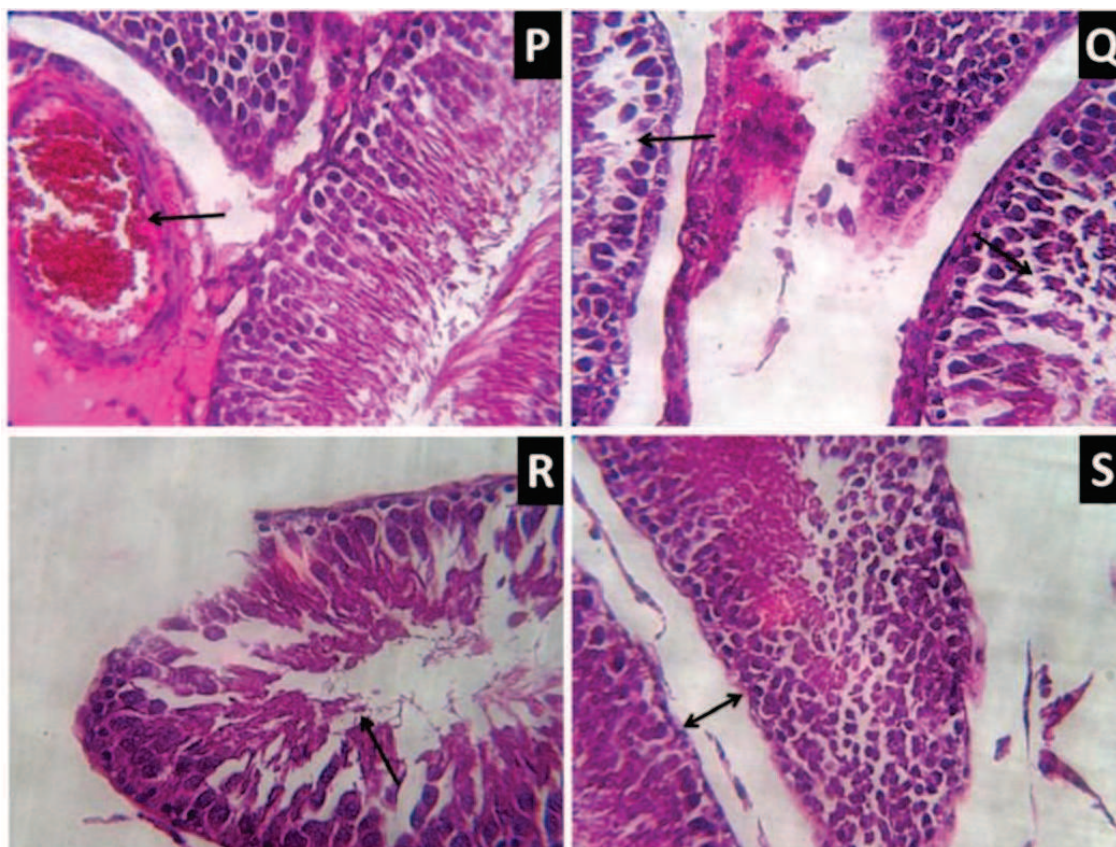


FIGURE 18 : COUPES DE TESTICULES DE RATS OBSERVEES EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES EXPOSITION A DES NANOPARTICULES DE SILICE DE 15 A 20 NM. D'APRES LES AUTEURS ON OBSERVE EN P : UNE IMAGE DE CONGESTION DU TESTICULE, EN Q : UN ARRET DE LA SPERMATOGENESE EN R : UNE IMAGE DE NECROSE TESTICULAIRE ET EN S : UN ŒDEME TESTICULAIRE. HASSANKHANI ET AL.

En conclusion nous observons qu'en dehors des études de Gao *et al.*, Zhao *et al.* et de Hassankhani *et al.* les anomalies histologiques observées restent assez peu nombreuses et semblent même réversibles dans un certain nombre de cas. Seules les anomalies décrites par Yoshida *et al.* sont évocatrices d'altérations qui ne sont pas réversibles. Concernant ces études sur modèle animal, il est intéressant de constater que bien que les quantités de nanoparticules atteignant le testicule ne sont pas à la hauteur des doses toxiques définies sur modèle cellulaire, des anomalies histologiques sont malgré tout observées laissant entrevoir une potentialisation de la toxicité des nanoparticules *in vivo*.

#### 4.5.4.4 ALTERATION DES PARAMETRES SPERMATIQUES

Plusieurs études se sont intéressées aux altérations des paramètres spermatiques. Les résultats sont résumés dans le Tableau 6. Il faut ajouter à ces résultats que les études de Bai *et al.* et de Garcia *et al.* ont également testé la fertilité des souris exposées respectivement aux nanotubes de carbone et aux nanoparticules d'argent en les faisant s'accoupler à des souris femelles. Aucune différence concernant le comportement sexuel, la capacité à initier une portée, le nombre de petits par portée ou leur état de santé n'a été constaté par rapport au groupe contrôle<sup>48,59</sup>.

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Etude	Modèle animal	Voie d'exposition	Nano particule	Taille (nm)	Concentration	Durée (j)	Nombre ou mesure de la DSP	Mobilité	Morphologie	Fragmentation de l'ADN	
<b>Yoshida et al. 2009</b> <sup>81</sup>	Souris	Inhalée	Noir de carbone	14	0,1 mg/s	7	-	NR	NR	NR	
				14	1,56 µg/s	7	-	NR	NR	NR	
				56	0,1 mg/s	7	-	NR	NR	NR	
				95	0,1 mg/s	7	-	NR	NR	NR	
<b>Bai et al. 2010</b> <sup>48</sup>	Souris	Intraveineuse	Nanotube de carbone		0,1 mg/souris ou 5 mg/kg	5	=	=	=	=	
<b>Gromadzka-Ostrowska et al. 2012</b> <sup>83</sup>	Rats	Intraveineuse	Argent	20	5 mg/kg	1	- à 24h et 28j	NR	=	+ à 24h	
					10 mg/kg	1	=	NR	=	+ à 24h	
				200	5 mg/kg	1	=	NR	=	=	
<b>Kyjevská et al. 2013</b> <sup>85</sup>	Souris gestantes	Inhalée	Noir de carbone	14	67 µg/s	4					
			Dioxyde de titane	21	42 mg/m <sup>3</sup>	4					
			Première génération (pour les 2 particules)						=	NR	NR
Deuxième génération par la mère (pour les 2 particules)						=	NR	NR	NR		
Deuxième génération par le père (pour les 2 particules)						-	NR	NR	NR		
<b>Gao et al. 2013</b> <sup>54</sup>	Souris	Orale	Dioxyde de titane	294	2.5 mg/kg	90	-	-	-	NR	
					5 mg/kg	90	-	-	-	NR	
					10 mg/kg	90	-	-	-	NR	
<b>Zhao et al. 2013</b> <sup>64</sup>	Souris	Orale	Dioxyde de titane	5.5	2.5 mg/kg	90	NR	NR	-	NR	

					5 mg/kg	90	NR	NR	-	NR
					10 mg/kg	90	NR	NR	-	NR
<b>Wang et al. 2013</b> <sup>57</sup>	Rats	Intra-articulaire	Chromocobalt	55	20 µg/kg/s em.	70	=	=	=	NR
					100 µg/kg/s em.	70	=	=	=	NR
					500 µg/kg/s em.	70	-	-	-	NR
<b>Xu et al. 2014</b> <sup>86</sup>	Souris	Intraveineuse	Silice	63	20 mg/kg/3 j	13	- à J15 et J35	- à J15	- à J15 et J35	+ à J15 et J35
<b>Garcia et al. 2014</b> <sup>59</sup>	Souris	Intraveineuse	Argent	10	1 mg/kg/3 j	15	=	=	NR	NR
<b>Jia et al. 2014</b> <sup>87</sup>	Souris	Orale	Dioxyde de titane	25	10 mg/kg/j	42	=	NR	=	NR
					50 mg/kg/j	42	=	NR	-	NR
					250 mg/kg/j	42	=	NR	-	NR
<b>Meena et al. 2015</b>	Rats	Intraveineuse	Dioxyde de titane	10 à 20	5 mg/kg/s em.	30	=	NR	NR	=
					25 mg/kg/s em.	30	=	NR	NR	+
					50 mg/kg/s em.	30	-	NR	NR	+

TABLEAU 6 : RESUME DES ETUDES AYANT EXPLORÉ L'IMPACT DES NANOPARTICULES SUR LES PARAMETRES SPERMATIQUES. = PAS DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE PAR RAPPORT AU CONTROLE. + AUGMENTATION SIGNIFICATIVE PAR RAPPORT AU CONTROLE. - DIMINUTION SIGNIFICATIVE PAR RAPPORT AU CONTROLE. NR : NON REALISE. DSP (DAILY SPERM PRODUCTION) : PRODUCTION JOURNALIERE DE SPERMATOZOÏDES.

En résumé les résultats de ces études sont particulièrement disparates, toutefois si l'on excepte les études de Gao *et al.* et de Zhao *et al.* peu fiables<sup>54,64</sup>, il semblerait que pour la majorité des études les nanoparticules étudiées ont un impact modéré sur les paramètres spermatiques, le plus souvent pour des doses élevées de particules et que cet effet est réversible à l'arrêt de l'exposition. Seul Yoshida *et al.* retrouve une forte diminution de la production spermatique pour toutes les

nanoparticules testées sans qu'une explication claire de cette différence ne puisse être donnée<sup>81</sup>. Au final il est une fois de plus difficile de tirer des conclusions claires de ces résultats du fait de la différence de modèle animal, de nanoparticules et de voie d'exposition d'une étude à l'autre. Afin de mieux définir les paramètres clés qui seraient susceptibles de favoriser une toxicité des nanoparticules sur la spermatogenèse, de nouvelles études doivent être mises en œuvre.

#### **4.5.4.5 PERTURBATEURS ENDOCRINIENS**

Plusieurs travaux ont émis l'hypothèse que les nanoparticules pourraient jouer le rôle de perturbateurs endocriniens. Ainsi, un certain nombre d'études ont tenté d'évaluer l'impact des nanoparticules sur la synthèse des hormones sexuelles sur divers modèles animaux.

Il y a tout d'abord toutes les études de l'équipe japonaise de l'institut national d'étude environnementale dont les travaux se sont intéressés à l'exposition par voie inhalée de rats ou de souris aux gaz d'échappement diesel filtrés (absence de nanoparticules diesels) ou non (présence de nanoparticules diesels). Ils ont montré en premier lieu que les gaz non filtrés augmentaient la synthèse de testostérone au niveau du testicule par rapport aux animaux non exposés ou exposés aux gaz filtrés<sup>92,93</sup>. Ces derniers présentaient au contraire, dans un certain nombre de cas, une diminution de cette synthèse. De façon intéressante ils ont noté que l'augmentation de la synthèse de testostérone survenait avant tout pour des doses de gaz d'échappement relativement faibles<sup>94,95</sup>. Ce phénomène pourrait trouver son explication dans les actions antagonistes de la fraction particulaire qui tend à augmenter la synthèse de testostérone et de la fraction gazeuse qui, à forte dose, tend à la réduire. Ainsi, à faible dose l'action de la fraction particulaire serait prédominante tandis qu'à plus forte dose c'est l'action de la fraction gazeuse qui serait prédominante. Une telle hypothèse reste toutefois à vérifier. Toujours dans ces études ils mettent en évidence que l'accroissement de la synthèse en testostérone pourrait être lié à la surexpression des gènes des enzymes responsables de celle-ci (P450scc et 17 $\beta$ -HSD) ainsi que des gènes de régulation (StAR). Cette surexpression pourrait elle-même être secondaire à une augmentation de la synthèse d'hormone de croissance<sup>95</sup>. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Komatsu et al. sur un modèle de cellules de Leydig qui constatait elle aussi une augmentation de la synthèse de testostérone et une surexpression du gène StAR après exposition aux nanoparticules diesel.

L'équipe de Yoshida et al. montre que l'exposition aux particules de noir de carbone de 14 nm et 56 nm par voie inhalée à la dose de 0,1 mg/souris pendant 7 jours entraîne une élévation de la testostéronémie<sup>81</sup>. Ceci n'est pas le cas pour les particules de 95 nm et pour les particules de 14 nm à une dose plus faible.

L'équipe de Tassinari et al., quant à elle révèle que l'exposition orale de rats mâles à des nanoparticules de dioxyde de titane de 45 nm pendant cinq jours à la dose de 2 mg/kg entraînait une augmentation de la synthèse de testostérone<sup>88</sup>. Ceci n'est pas retrouvé à la dose de 1 mg/kg. De façon intéressante, ils montrent également que la même exposition chez des femelles entraînait une diminution de cette synthèse.

Après quinze jours d'exposition à des nanoparticules d'argent (1 mg/kg/3j) par voie intraveineuse chez la souris, l'équipe de Garcia et al. retrouve une augmentation des taux de testostérones dans le sang comme dans le testicule<sup>59</sup>. Celle-ci est toutefois rapidement réversible après l'arrêt de l'exposition. L'analyse des ARNm retrouve une augmentation de l'expression des gènes de Cyp11a1 et de HSD3B1 gènes codant pour des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse (respectivement P450scc et 3 $\beta$ HSD1) mais pas d'augmentation de StAR ni d'IGF1.

La majorité des études concluent ainsi à une augmentation de la synthèse de testostérone en présence de nanoparticules mais plusieurs études divergent :

- L'étude de Li *et al.* sur des rats exposés *in utero* à des gaz d'échappement de moteur diesel filtré ou non pour lesquels il est constaté une diminution de la synthèse de testostérone testiculaire accompagnée par une diminution de la synthèse de FSH et de progestérone et une augmentation de la synthèse d'inhibine<sup>82</sup>. L'analyse de l'expression des gènes montre une surexpression du gène du récepteur à la FSH dans le groupe exposé aux gaz non filtrés et une sous-expression des gènes de la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (17  $\beta$ -HSD) et du gène StAR dans les deux groupes. Les autres gènes impliqués dans la stéroïdogénèse ne semblent pas affectés. Ces résultats vont à l'encontre de ceux formulés précédemment par l'équipe. Toutefois, en reprenant l'hypothèse présentée ci-dessus, il est possible d'expliquer cette divergence. En effet, nous pouvons supposer que pour le mâle *in utero* l'action de la partie gazeuse est plus importante que celle des nanoparticules, par exemple, du fait d'une incapacité des particules diesel à franchir la barrière hémato-placentaire en quantité suffisante au contraire des éléments gazeux dissous. Ceci expliquerait l'impact similaire d'une exposition maternelle aux gaz filtrés ou non filtrés.
- L'étude de Bai *et al.* qui ne retrouve, chez la souris, aucun impact de l'exposition par voie intraveineuse aux nanotubes de carbone pendant 5 jours sur les taux de LH, de FSH et de testostérone, 15 jours, 60 jours et 90 jours après l'arrêt des injections<sup>48</sup>.
- L'étude de Xu *et al.* qui ne retrouve, chez la souris, aucun impact de l'exposition par voie intraveineuse (20 mg/kg, 5 injections sur 13 jours) à des particules de silice de 63 nm sur

les taux de LH, de FSH et de testostérone à J15, J35 et J60 par rapport au début des injections<sup>86</sup>.

- L'étude de Gao *et al.* qui observe, chez la souris, après une exposition à des nanoparticules de dioxyde de titane de 294 nm par voie orale pendant 90 jours, une augmentation des taux plasmatiques d'œstradiol et de progestérone et une diminution des taux de LH, FSH et testostérone<sup>54</sup>.
- Avec des nanoparticules similaires à l'étude de Tassinari *et al.* et une voies d'exposition identique mais à une dose plus élevée (50 mg/kg/j), l'étude de Jia *et al.* retrouve des résultats totalement opposés, à savoir une diminution de la testostéronémie<sup>87</sup>. L'étude des ARN messagers retrouve une diminution de l'expression des gènes des enzymes P450-17 $\alpha$  hydroxylase et 17 $\beta$ -HSD toutes deux impliquées dans la stéroïdogenèse et une augmentation de l'expression du gène Cyp19 qui code pour l'aromatase transformant les androgènes en œstrogène. Il est à noter qu'aucune variation de l'expression du gène StAR n'est retrouvée dans cette étude
- Toujours avec des nanoparticules de titane l'étude de Meena *et al.* présente des conclusions similaires en montrant également une diminution de la testostéronémie après injection par voie intraveineuse de nanoparticules de titane à dose élevées (25 mg/kg/semaine sur 4 semaines).

Même si le nombre d'études reste insuffisant pour comprendre l'ensemble des déterminants de l'impact des nanoparticules sur la synthèse des hormones sexuelles chez le mâle, il semble toutefois évident que les nanoparticules peuvent avoir un rôle de perturbateur endocrinien.

#### **4.5.4.6 GENOTOXICITE**

La génotoxicité des nanoparticules a d'ores et déjà été très abondamment étudiée et de nombreux travaux ont été publiés<sup>96,97</sup>. Toutefois en faire la revue sortirait du cadre de cette thèse c'est pourquoi nous nous intéresserons uniquement aux études ayant évalué la génotoxicité testiculaire (en dehors des modifications de l'expression des gènes liés à la synthèse hormonale) qui sont finalement assez peu nombreuses.

L'étude de Yauk *et al.* évalue l'impact de l'exposition à un air pollué par deux aciéries et une autoroute, contre un air filtré par un filtre à particule de diamètre 0,3  $\mu$ m, sur les dommages à l'ADN de la lignée germinale chez des souris mâles adultes<sup>98</sup>. Les analyses sont réalisées sur 3 temps : 3 semaines d'exposition qui mesurent l'impact de la pollution particulaire sur la fin de la spermatogenèse, 10 semaines d'exposition qui mesurent l'impact de la pollution particulaire sur l'ensemble de la spermatogenèse, puis 10 semaines d'exposition suivies de 6 semaines sans



exposition qui mesurent l'impact de la pollution particulaire sur les spermatogonies et ses conséquences à long terme. Après 10 semaines d'exposition puis 6 semaines sans exposition ils constatent une augmentation des mutations double brins par rapport au contrôle ce qui n'était pas le cas à 3 semaines et 10 semaines d'exposition. A aucun moment ils ne constatent une augmentation de la fréquence des adduits sur l'ADN, en revanche la fréquence des cassures est augmentée à 3 semaines et 10 semaines d'exposition. Enfin, ils constatent également une hyperméthylation de l'ADN par deux techniques distinctes (cytosine extension assay et methyl-acceptance assay) à 10 semaines d'exposition qui persiste même après 6 semaines sans exposition. Au final la génotoxicité connue de certaines nanoparticules sur les lignées somatiques se retrouve bien au niveau de la lignée germinale.

L'étude de Gao *et al.* s'est attaché à évaluer l'expression de 254 gènes par l'utilisation de puces à ADN puis 14 autres par PCR quantitative inversée et de mesurer les mêmes protéines par technique ELISA. De ces analyses, les auteurs retiennent une diminution de l'expression des gènes des protéines de transition lors de la condensation de l'ADN et des protamines (Prm1 et Tnp2), une diminution de l'expression des protéines permettant au spermatozoïde de se fixer sur la zone pellucide (Adam3) et une diminution des protéines Spata19 and Tdrd6 impliquées dans la spermatogenèse. Ils notent également la surexpression de Ly6e mais d'après eux cette protéine ne sert à rien dans la spermatogenèse, ce qui n'explique pas pourquoi les auteurs ont souhaité la tester malgré tout. Ils montrent ensuite une variation dans l'expression de plusieurs molécules impliquées dans la stéroïdogénèse dans un sens comme dans l'autre (Sc4mol, Mvd, Srd5a2, Cyp2e1 et Leptine). La même équipe a ensuite démontré une augmentation de l'expression des gènes liés à l'apoptose en particulier ceux de la caspase-3, de Nr1p2, et du cytochrome c<sup>64</sup>. Au final, des modifications d'ausi grande ampleur confirmant toutes les hypothèses des auteurs jettent une fois de plus le doute sur la vraisemblance des résultats de ces deux études.

#### **4.5.4.7 METABOLISME TESTICULAIRE**

Peu d'études se sont particulièrement intéressées à l'impact des nanoparticules sur le métabolisme cellulaire. Toutefois, il a été montré que les nanotubes de carbone<sup>48</sup>, les nanoparticules de silice<sup>86</sup> (63 nm), les nanoparticules de chrome-cobalt<sup>57</sup> et les nanoparticules de dioxyde de titane<sup>60</sup> avaient la capacité d'augmenter transitoirement les taux de malondialdehyde (MDA) traduisant un stress oxydant. L'activité de la catalase et de la superoxyde dismutase, enzymes chargées de la lutte contre le stress oxydant, ne semblent pas être affectés par la présence de nanoparticules de silice mais sont respectivement augmentées et diminuées en présence de nanoparticules de dioxyde de titane. Les activités de l'ensemble des enzymes antioxydantes sont diminuées en présence de nanoparticules de

chrome-cobalt. Il a également été montré que les nanoparticules de silice peuvent avoir un impact sur le métabolisme énergétique en réduisant la synthèse d'ATP. Toutefois ce phénomène est réversible et les autres voies métaboliques ne semblent pas affectées par ces nanoparticules<sup>86</sup>. Sur un modèle de cellules souches spermatogoniales, il est montré que les nanoparticules d'argent influencent peu la production de radicaux libres et n'entraîne pas d'augmentation de l'apoptose sauf pour les plus petites lorsqu'elles sont fonctionnalisées par des polysaccharides<sup>72</sup>. Alors que chez le rat, les nanoparticules de dioxyde de titane entraînent une augmentation de l'expression de la caspase 3, marqueur d'apoptose<sup>60</sup>.



## 5 IMPACT DE L'ALUMINIUM SUR LA FONCTION DE REPRODUCTION

### MASCULINE

#### 5.1 L'ALUMINIUM

L'aluminium est un élément chimique métallique appartenant à la catégorie des métaux pauvres (bloc p du tableau périodique) comme le plomb ou l'étain. Son symbole est « Al » dans la classification périodique des éléments, son numéro atomique est le 13. Il s'agit du troisième élément le plus abondant de l'écorce terrestre derrière l'oxygène et le silicium, il représente ainsi 8,3% de la surface terrestre <sup>99</sup>. C'est un métal particulièrement réactif qui n'existe que très peu à l'état natif dans le milieu naturel. Pour l'essentiel, il est présent sous la forme de minéraux, le principal étant la bauxite, roche latéritique riche en hydroxyde et oxyde d'aluminium et de fer. L'aluminium en est extrait sous la forme d'alumine (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). La production mondiale de bauxite atteignait 211 millions de tonnes en 2010 <sup>100</sup>, les principaux producteurs étant l'Australie, la Chine, l'Inde, le Brésil et la Guinée. 41,4 millions de tonnes d'aluminium en ont été extraites principalement en Chine.

L'aluminium présente de nombreuses propriétés <sup>101</sup>. Il s'agit d'un métal très léger, sa densité spécifique est de 2,7 g/cm<sup>3</sup> soit environ trois fois plus faible que celle de l'acier ou du cuivre. Il présente une forte résistance mécanique. Une fine couche d'alumine se forme spontanément à la surface de l'aluminium exposé à l'air protégeant le cœur métallique de l'oxydation et le rendant très résistant à la corrosion. Il présente une très bonne conduction thermique (240 W /m °C) et électrique (à poids égal, elle est deux fois supérieure à celle du cuivre). Il est extrêmement ductile et malléable, lui permettant d'être travaillé à basse température. Il est recyclable à très bas coût sans aucune perte de ses autres propriétés. En 2010, 70% de l'aluminium consommé en Europe était d'origine recyclée. Poli, il possède un fort pouvoir réfléchissant : 85 à 90 % dans le spectre visible, 90 à 98% dans l'infrarouge. Enfin, il possède un important effet-barrière et ne libère aucun goût ni aucune odeur.

Son exploitation n'a cessé d'augmenter et a ainsi été multipliée par 30 entre 1950 et 2013 (Figure 19)<sup>102</sup>. Les estimations vont dans le sens d'une nouvelle multiplication par 2 ou 3 d'ici 2050.

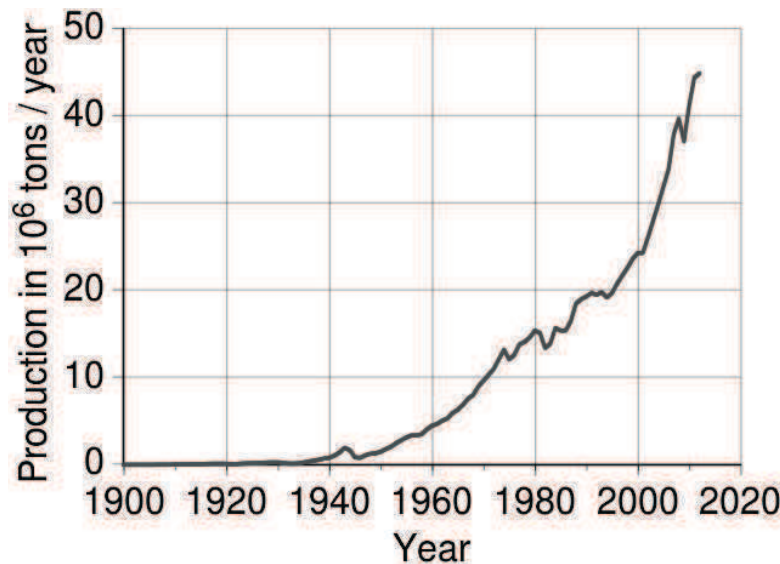


FIGURE 19 : EVOLUTION DE LA PRODUCTION ANNUELLE D'ALUMINIUM, U.S. GEOLOGICAL SURVEY

## 5.2 APPLICATIONS ET EXPOSITION À L'ALUMINIUM

Les applications de l'aluminium sont nombreuses et ne cessent de croître dans des domaines extrêmement variés. On citera notamment :

- le bâtiment (portes, fenêtres, stores, radiateurs...) pour son faible coût, sa résistance mécanique et à l'oxydation et ses capacités réfléchissantes
- les transports (train, voiture, aéronautique) pour sa légèreté, sa grande résistance mécanique et à la corrosion et sa bonne conduction thermique
- l'ingénierie (impression, machines textiles, instruments scientifiques)
- l'électronique du fait de son excellente conductivité électrique

Toutefois trois domaines retiennent particulièrement l'attention au regard de l'exposition qu'ils entraînent pour les populations : l'alimentation, la cosmétique et la médecine.

### 5.2.1 L'ALIMENTATION

Du fait de son important effet barrière et de son absence totale de goût, l'aluminium est très utilisé pour la réalisation d'emballages alimentaires, il est également directement intégré dans certains aliments comme colorant ou conservateur. Aujourd'hui, en France, les emballages ménagers en aluminium représentent 50.000 tonnes par an (Figure 20). (Source ADEME)

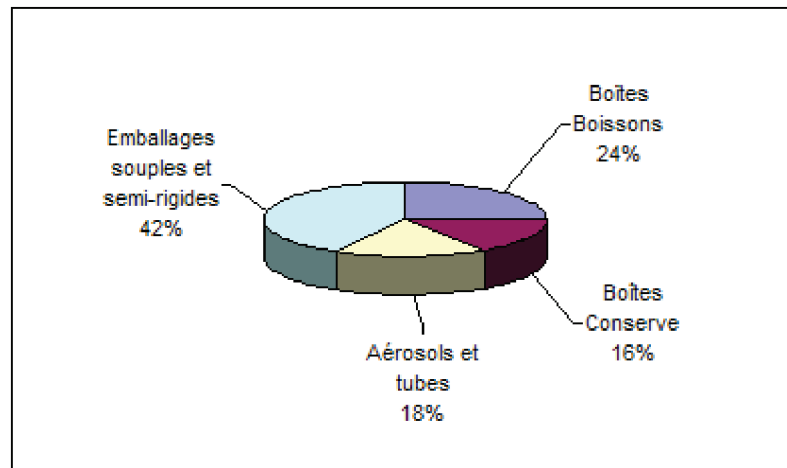


FIGURE 20 : REPARTITION DES EMBALLAGES MENAGERS EN ALUMINIUM EN 2010 (SOURCE : [WWW.FRANCE-ALU-RECYCLAGE.COM](http://WWW.FRANCE-ALU-RECYCLAGE.COM))

De nombreuses études ont montré l'existence d'une contamination alimentaire par l'aluminium dans les produits cuisinés avec des ustensiles en aluminium et/ou stockés au sein d'emballages en aluminium<sup>103,104</sup>. Dans la majorité des cas cette contamination reste faible voire négligeable<sup>105</sup> et n'augmente pas l'exposition à l'aluminium au-delà des valeurs limites d'exposition<sup>106</sup>. Dans un rapport de 2011, l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments et des Produits de Santé), maintenant ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament), estime l'exposition alimentaire de l'enfant à 0,7 mg/kg/sem. et celle de l'adulte à 0,4 mg/kg/sem.<sup>107</sup> pour une dose hebdomadaire maximale fixée à 1 mg/kg/sem. par l'OMS depuis 2008.

Pour les sujets ne présentant pas d'autres expositions spécifiques (médicales ou professionnelles), l'exposition alimentaire est la principale source d'exposition à l'aluminium. Toutefois toutes les études publiées sur le sujet s'accordent sur la faible absorption digestive de l'aluminium comprise entre 0.01 et 1 % de la dose ingérée<sup>108</sup>.

### 5.2.2 LA COSMÉTIQUE

L'aluminium est retrouvé dans de très nombreux produits cosmétiques :

- Dans les déodorants du fait de ses propriétés anti-transpirantes, le plus souvent sous la forme de chlorhydrate d'aluminium.
- Dans les produits dentaires ou les soins pour le visage ou le corps du fait de ses propriétés abrasives.
- Dans les maquillages où il sert d'agent de viscosité.
- Dans les crèmes solaires.
- Dans les masques pour le visage où il est utilisé en tant qu'agent absorbant sous la forme de silicate d'aluminium.

En dehors du cas spécifique des masques pour le visage, les concentrations les plus importantes sont retrouvées dans les anti-transpirants qui constituent la source d'exposition prédominante en cosmétique. Il a été montré que le passage de l'aluminium dans la circulation systémique est très faible sur une exposition de courte durée, toutefois il existe un stockage cutané de 0,5% de la dose déposée sur peau saine et de 17,2% sur peau lésée<sup>109</sup>. Ce résultat laisse craindre une accumulation cutanée qui sur le long terme est susceptible d'entraîner un passage systémique plus important. Afin de limiter les risques de toxicité de l'aluminium, l'AFSSAPS a émis une recommandation en 2011 visant à réduire à 0,6% la concentration en aluminium pure dans les anti-transpirants<sup>107</sup>. Ceci serait à l'origine d'une diminution de la quantité de chlorhydrate d'aluminium qui passerait de 20% en moyenne actuellement, à environ 2%...

### 5.2.3 LA MÉDECINE

L'utilisation de l'aluminium dans le domaine médical est également très répandue. On le retrouve ainsi dans la fabrication des prothèses orthopédiques ou dentaires. Certains protecteurs gastriques contiennent de grandes quantités d'aluminium : jusqu'à 400 mg par sachet, ce qui pour une prise maximale de 12 sachets par jour pendant une semaine chez un homme de 70 kg entrainera une exposition de l'ordre de 480 mg/kg/sem., soit 480 fois la dose hebdomadaire maximale fixée par l'OMS. Enfin certains vaccins et la majorité des immunothérapies antiallergiques contiennent une quantité non négligeable d'aluminium directement injectée aux patients<sup>110,111</sup>.

Dans les années antérieures les bains de dialyse contenaient de grandes quantités d'aluminium ajoutées en tant que chélateur du phosphate. La survenue d'encéphalites chez les patients dialysés, secondaire à une intoxication à l'aluminium, a poussé la réglementation européenne à fixer un seuil maximal de concentration en aluminium dans les bains de dialyse de 10 µg/L.

L'alimentation parentérale est une autre source importante d'exposition à l'aluminium en particulier chez l'insuffisant rénal ou l'enfant. L'American Society for Clinical Nutrition et le Groupe de travail de l'American Society for Parenteral and Enteral Nutrition<sup>112</sup> ont défini trois seuils de risque concernant les personnes exposées à l'aluminium lors de nutritons parentérales :

- Pas de risque d'accumulation ou de toxicité (1-2 µg/kg/j.),
- Risque d'accumulation (15-30 µg/kg/j.),
- Risque de toxicité (60 µg/kg/j.).

Sur la base de ces conclusions la FDA (Food and Drug Administration) a émis une recommandation visant à limiter la teneur en aluminium des solutés utilisés en alimentation parentérale à 25 µg/l en stipulant de ne pas dépasser 5 µg/kg/j<sup>113</sup>. Malgré ces nouvelles recommandations, une étude publiée

en 2006 montrait que la dose de 5 µg/kg/j était encore largement dépassée chez les enfants prématurés<sup>114</sup>. Les auteurs demandaient aux industriels du secteur de redoubler d'efforts pour réduire encore la quantité d'aluminium dans les poches d'alimentation parentérale destinées aux enfants.

#### **5.2.4 CONTAMINATION DE L'AIR ET DE L'EAU**

A ces expositions liées aux applications de l'aluminium il faut ajouter l'exposition liée à l'air et à l'eau. Un air non contaminé contient environ 100 ng/m<sup>3</sup> d'aluminium, mais ces valeurs peuvent être multipliées par 1000 dans des zones industrielles fortement exposées<sup>115</sup> ou chez les fumeurs de cigarettes ou de cannabis<sup>116</sup>. De même les normes en matière de contamination des eaux par l'aluminium définies par l'OMS sont de 0,2 mg/l. La majorité des eaux potables sont en dessous de ce seuil mais là encore des variations importantes existent notamment dans les communes utilisant le chlorure d'aluminium ou le sulfate d'aluminium comme agent flocculant pour le traitement des eaux usées.

### 5.2.5 CONCLUSIONS CONCERNANT L'EXPOSITION A L'ALUMINIUM

	Concentrations en aluminium dans les milieux*	Estimation de l'apport journalier en aluminium pour un adulte	Réglementation
<b>Air</b>			
• Urbain	1 000 ng/m <sup>3</sup> (160-7 000)	Pour un débit ventilatoire de 20 m <sup>3</sup> / 24h <b>0,02 mg</b>	Valeur limite de moyenne d'exposition (VME)
• Rural	200 ng/m <sup>3</sup> (150-325)	<b>0,004 mg</b>	
• Milieu professionnel (industrie de l'aluminium)		Pour un débit ventilatoire de 10 m <sup>3</sup> /8h et 8 heures de travail/24h avec 5 mg/ m <sup>3</sup> : <b>50 mg (soit 33 mg/j pour une exposition quotidienne 7j/7 12 mois/12)</b>	5 mg/m <sup>3</sup> (poussières inhalables ) 10 mg/m <sup>3</sup> (poussières totales )
<b>Sols</b>			
• Agricoles	70 000 mg/kg (10 000-300 000)	?	
• Villes	0,0037 à 0,0116 mg/kg	?	
<b>Eaux</b>			
• Pluies	50 µg/L (10-1 200)		
• Eau douce	50 µg/L (1-2 250)		
• Eau de mer	2 µg/L (1-5)		
• Distribution	100 µg/L (< 10-1 000)	Consommation : 2l/j <b>0,2 mg</b>	200 µg/L (valeur guide)
<b>Alimentation</b>	Variable selon aliment	<b>2,5 à 13 mg/j</b>	
<b>Antiacides</b>		<b>840 à 5 000 mg/j</b>	
<b>Antiperspirants</b>	?	?	
<b>Apports totaux</b>			Dose hebdomadaire tolérable (DHTP) :
• Non professionnel		<b>3 à 15 mg/j</b> (sans antiacide)	<b>420 mg/semaine</b> pour un adulte de 60 kg
• Professionnel de l'aluminium		<b>&lt; 50 mg/j</b> (sans antiacide)	

TABEAU 7 : ESTIMATION DE L'EXPOSITION DES POPULATIONS A L'ALUMINIUM<sup>101</sup>. \* VALEUR MOYENNE DE REFERENCE RETENUE POUR DES ESTIMATIONS GLOBALES.

La source d'exposition principale de la population générale à l'aluminium est l'alimentation (Tableau 7). Toutefois, les expositions médicales ou professionnelles peuvent largement dépasser cette dernière chez les personnes concernées.

### 5.3 TOXICITÉ DE L'ALUMINIUM

Du fait de cette exposition croissante à l'aluminium de nombreuses études ont été menées afin d'évaluer son impact potentiel sur la santé humaine. Il est aujourd'hui bien établi qu'au moins deux

types de pathologies peuvent être liés à l'aluminium : les atteintes neurologiques et les pathologies osseuses.

### 5.3.1 ATTEINTES NEUROLOGIQUES

Les atteintes neurologiques liées à l'aluminium ont à l'origine été mises en évidence chez des patients insuffisants rénaux et exposés à de forte concentration d'aluminium par les bains de dialyse et les gels chélateurs de phosphate à base d'aluminium<sup>117</sup>. Les patients présentaient des encéphalopathies d'étiologie indéterminée conduisant rapidement au décès. D'autres études ont ensuite confirmé l'implication de l'aluminium en montrant une accumulation importante d'aluminium dans les muscles, les os et le cerveau de ces patients dialysés (respectivement 23,6 ; 98,5 et 25 mg/kg d'organe sec) par rapport à des sujets contrôles non dialysés (respectivement 1,2 ; 2,4 et 2,2 mg/kg d'organe sec)<sup>118</sup>. Ces cas d'encéphalopathies liées à l'aluminium ont disparu suite au traitement par déferoxamine, un chélateur de l'aluminium, et à l'apparition de solutions de dialyse déplétées en aluminium et de gels chélateurs de phosphate à base de carbonate de calcium<sup>119</sup>.

Des troubles neurologiques ont également été constatés chez les enfants prématurés ayant bénéficié d'une alimentation parentérale. Ainsi à 18 mois, la comparaison du développement neurologique de 39 enfants ayant reçu une alimentation prolongée riche en aluminium et de 41 enfants ayant reçu une alimentation pauvre en aluminium a montré un score de développement de Baley inférieur chez les premiers par rapport aux seconds (92 vs 102)<sup>120</sup>. De même, une diminution des performances psychomotrices a été observée chez des insuffisants rénaux fortement exposés à l'aluminium<sup>121</sup> ou chez des sujets subissant une exposition professionnelle<sup>122</sup>.

Enfin de nombreuses études ont évoqué la possibilité d'un lien entre exposition à l'aluminium et maladie d'Alzheimer. Toutefois les études réalisées, que ce soit dans la population générale, chez des insuffisants rénaux ou en milieu professionnel, n'ont pas permis de confirmer l'existence d'un tel lien à l'heure actuelle<sup>108</sup>.

### 5.3.2 ATTEINTES IMMUNOLOGIQUES

L'aluminium possède un fort pouvoir immunogène, surtout dans sa forme cristalline (hydroxyde d'aluminium). Cette propriété fait que l'aluminium est utilisé depuis de nombreuses années comme adjuvant vaccinal. Toutefois il s'avère que chez certain patients, cette utilisation peut être à l'origine d'une pathologie : la myofascite à macrophage. Cette maladie, découverte en 1993 par l'équipe du Pr Romain Gherardi, associe des lésions histologiques pathognomoniques au sein du muscle deltoïde, siège de la vaccination, (infiltrats inflammatoires localisés dans l'épimysium, le péri-mysium ou l'endomysium périfasciculaire constitué de monocytes/macrophages à contenu cytoplasmique

finement granuleux, PAS (periodic acid-Schiff) positif associé à un contingent lymphocytaire) et des signes cliniques variables (myalgies, arthralgies, asthénie...). Le mécanisme physiopathologique de cette maladie ainsi que les déterminants des susceptibilités individuelles sont encore inconnus.<sup>123,124</sup>

### 5.3.3 ATTEINTES OSSEUSES

Plusieurs études ont montré la possibilité qu'avait l'aluminium de s'accumuler au niveau de l'os et d'engendrer une ostéomalacie<sup>†125,126</sup>. Ce phénomène semble toutefois réversible après arrêt de l'exposition<sup>127</sup>.

### 5.3.4 CANCER

En 2008, l'EFSA (European Food Safety Authority) conclut que « la base de données sur la cancérogénèse des composés aluminiques est limitée. Dans l'étude la plus récente, rien n'a indiqué un quelconque potentiel cancérogène chez des souris ayant reçu du sulfate d'aluminium et de potassium ajouté à fortes doses dans l'alimentation. Globalement, le groupe scientifique a conclu qu'il est improbable que l'aluminium soit cancérogène chez l'Homme aux doses alimentaires pertinentes ».

En effet les études animales ne retrouvent globalement pas d'augmentation du risque de développement de tumeurs après exposition alimentaire, même après une longue période<sup>128,129</sup>. Celles qui retrouvent un lien potentiel manquent de précision dans la description des résultats<sup>130</sup>.

En 1987, le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) a classé le processus de production d'aluminium comme processus cancérogène certain pour l'homme du fait d'études épidémiologiques montrant un risque accru de cancer du poumon et de la vessie. Après une nouvelle analyse des différentes études, il s'est avéré qu'il existait systématiquement d'autres facteurs d'exposition, notamment des hydrocarbures, pouvant expliquer la survenue de ces cancers<sup>108</sup>. Concernant la relation possible entre l'utilisation d'anti-transpirants à l'aluminium et la survenue de cancer du sein, les études réalisées soit présentent des biais méthodologiques comme le confirme la revue de la littérature réalisée par Namer *et al.* en 2008<sup>131</sup> et l'évaluation réalisée en 2008 par

---

† Ostéomalacie : défaut de minéralisation du tissu osseux, le plus souvent lié à une carence en vitamine D. Elle se manifeste par des douleurs et une fatigue musculaire. Chez l'enfant on parle de rachitisme.



l'Institut National du Cancer des Etats-Unis d'Amérique<sup>132</sup> ; soit concluent à l'absence d'impact de l'aluminium sur la survenue du cancer du sein<sup>133</sup>.

De ce fait, l'OMS concluait en 1997 qu'en l'état actuel des connaissances, l'aluminium ne pouvait être considéré comme un agent cancérigène. Aucune donnée récente ne semble pour l'instant remettre en cause ce constat.

## 5.4 REPROTOXICITÉ MASCULINE DE L'ALUMINIUM

La toxicité de l'aluminium sur l'appareil reproducteur masculin a été étudiée de façon croissante ces 20 dernières années à mesure que les études révélaient de possibles effets délétères.

Ainsi dès 1964, Kamboj et Kar montrent qu'une injection intra-testiculaire de 0,08 mg/kg de sulfate d'aluminium entraîne une nécrose partielle du testicule, tandis que l'exposition pendant 30 jours par voie sous cutanée semble bloquer la spermatogenèse<sup>134</sup>. A partir de là de nombreuses études sur modèles animaux ont tenté d'explorer cette toxicité. Toutefois, les différences entre les modèles animaux, les voies d'exposition, les formes chimiques de l'aluminium et les doses d'exposition rendent difficile le travail de synthèse permettant de définir la reprotoxicité de l'aluminium.

Il est tout d'abord nécessaire d'évoquer plusieurs travaux réalisés sur la toxicité testiculaire du chlorure d'aluminium par des chercheurs égyptiens<sup>135-139</sup>. Les études étaient construites de manière variable avec une exposition *in vivo* de souris, de rats et de lapins ou *in vitro* de sperme de lapins à des doses allant jusqu'à 34 mg/kg/j sur des périodes allant jusqu'à 70 jours par voie orale ou intra-péritonéale. Dans chacune des études les effets délétères de l'exposition au chlorure d'aluminium sont mesurés afin de pouvoir tester le pouvoir protecteur de certaines molécules aux propriétés anti-oxydantes : gingembre, taurine, acide ascorbique, vitamines C et E et propolis. Selon ces auteurs le chlorure d'aluminium a un effet délétère sur tous les paramètres qu'ils ont étudiés (poids et histologie testiculaire, génération de radicaux libres, synthèse de testostérone, caractéristiques spermatiques, fonctionnalité des glandes annexes...) et l'ensemble des molécules testées antagonise presque totalement les effets de celui-ci. Ces résultats sont si concordants et si parfaitement représentatifs des hypothèses des auteurs qu'il est possible de douter de leur vraisemblance. Le suivi des paramètres spermatiques au travers des différentes études illustre bien ce problème (Tableau 8).

Table 3. Sperm picture of control and treated rats (mean ± SE)

Treatment	30 days			45 days			60 days		
	Individual motility%	Live/dead %	Abnormalities%	Individual motility%	Live/dead %	Abnormalities%	Individual motility%	Live/dead %	Abnormalities%
Control	75.00 ± 3.03 <sup>a</sup>	5.35 ± 1.36 <sup>a</sup>	18.67 ± 12.24 <sup>b</sup>	78.00 ± 2.00 <sup>a</sup>	5.38 ± 0.39 <sup>a</sup>	25.50 ± 1.50 <sup>a</sup>	81.66 ± 1.69 <sup>a</sup>	5.90 ± 0.70 <sup>a</sup>	20.33 ± 3.76 <sup>b</sup>
AlCl <sub>3</sub>	23.40 ± 5.02 <sup>b</sup>	0.98 ± 0.33 <sup>b</sup>	56.75 ± 6.05 <sup>a</sup>	25.40 ± 2.87 <sup>b</sup>	1.66 ± 0.28 <sup>b</sup>	54.00 ± 3.01 <sup>b</sup>	23.33 ± 6.28 <sup>b</sup>	1.60 ± 0.14 <sup>b</sup>	57.67 ± 1.47 <sup>a</sup>
AlCl <sub>3</sub> + ginger	56.00 ± 8.26 <sup>a</sup>	3.92 ± 0.45 <sup>a</sup>	25.67 ± 9.90 <sup>b</sup>	85.00 ± 2.83 <sup>a</sup>	2.28 ± 0.42 <sup>b</sup>	24.00 ± 1.00 <sup>a</sup>	80.00 ± 1.95 <sup>a</sup>	4.08 ± 0.25 <sup>a</sup>	15.00 ± 0.59 <sup>b</sup>

In the same column, values with different superscript letters (a, b and c) were significantly differ (p ≤ 0.05).

Table 2  
Effect of ascorbic acid (AA), aluminium chloride (AlCl<sub>3</sub>) and/or their combination on semen characteristics of male rabbits (means ± S.E.)

Parameter	Groups			
	Control	AA	AlCl <sub>3</sub>	AA + AlCl <sub>3</sub>
Ejaculate volume (ml)	0.67 ± 0.140 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.018 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.012 <sup>d</sup>	0.64 ± 0.012 <sup>c</sup>
pH	7.66 ± 0.024 <sup>b</sup>	7.41 ± 0.033 <sup>d</sup>	8.08 ± 0.039 <sup>a</sup>	7.60 ± 0.018 <sup>c</sup>
Reaction time (s)	2.04 ± 0.103 <sup>c</sup>	1.73 ± 0.051 <sup>c</sup>	4.30 ± 0.273 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.090 <sup>b</sup>
Packed sperm volume (%)	19.9 ± 0.20 <sup>b</sup>	22.4 ± 0.27 <sup>a</sup>	17.7 ± 0.29 <sup>d</sup>	19.1 ± 0.17 <sup>c</sup>
Sperm concentration (×10 <sup>6</sup> ml <sup>-1</sup> )	236 ± 2.0 <sup>b</sup>	275 ± 4.0 <sup>a</sup>	205 ± 4.2 <sup>c</sup>	231 ± 2.3 <sup>b</sup>
Total sperm output (×10 <sup>6</sup> )	159 ± 3.7 <sup>b</sup>	221 ± 6.9 <sup>a</sup>	121 ± 4.3 <sup>d</sup>	148 ± 3.1 <sup>c</sup>
Sperm motility (%)	69.0 ± 0.7 <sup>b</sup>	78.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	62.6 ± 1.2 <sup>d</sup>	66.0 ± 0.8 <sup>c</sup>
Total motile sperm (×10 <sup>6</sup> )	109 ± 2.7 <sup>b</sup>	175 ± 6.9 <sup>a</sup>	79 ± 3.8 <sup>d</sup>	100 ± 2.3 <sup>c</sup>
Dead sperm (%)	23.0 ± 0.36 <sup>c</sup>	16.2 ± 0.63 <sup>d</sup>	32.4 ± 0.96 <sup>a</sup>	25.6 ± 0.42 <sup>b</sup>
Normal sperm (%)	83.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	88.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	78.8 ± 0.5 <sup>d</sup>	82.6 ± 0.3 <sup>c</sup>
Total functional sperm fraction (×10 <sup>6</sup> )	92 ± 7.2 <sup>b</sup>	156 ± 6.8 <sup>a</sup>	79 ± 3.7 <sup>c</sup>	83 ± 1.9 <sup>c</sup>
Initial fructose (mg/dl)	234 ± 2.3 <sup>b</sup>	263 ± 3.8 <sup>a</sup>	202 ± 4.4 <sup>d</sup>	227 ± 2.2 <sup>c</sup>

The mean value represents 96 values for each treatment. Within row, means with different superscript letters (a–d) differ significantly (P < 0.05).

Table 2  
Changes in sperm concentration (Sp. Conc., ×10<sup>6</sup>/ml), motility (%), and dead (%) and abnormal (%) sperm of male rats treated with AlCl<sub>3</sub>, propolis and AlCl<sub>3</sub> + propolis.

Parameter	Experimental groups			
	Control	AlCl <sub>3</sub>	Propolis	AlCl <sub>3</sub> - Propolis
Sp. Conc.	212 ± 15.5	148 ± 8.1 <sup>~</sup>	233 ± 12.1 <sup>**</sup>	199 ± 7.5 <sup>**</sup>
Motility	72.4 ± 1.89	50.9 ± 2.64 <sup>~</sup>	79.7 ± 1.64 <sup>**</sup>	70.5 ± 1.43 <sup>**</sup>
Dead	25.2 ± 1.95	45.1 ± 2.21 <sup>~</sup>	20.2 ± 1.78 <sup>**</sup>	28.8 ± 3.01 <sup>**</sup>
Abnormal	14.6 ± 1.96	21.3 ± 2.312 <sup>~</sup>	11.6 ± 1.27 <sup>**</sup>	16.7 ± 1.337 <sup>**</sup>

Values are expressed as means ± SD; n = 10 for each treatment group.  
Significant difference from the control group at <sup>~</sup>P < 0.05 and <sup>\*\*</sup>P < 0.01.

TABLEAU 8 : TABLEAUX ISSUS DE DIVERS ARTICLES ECRITS PAR UNE EQUIPE EGYPTIENNE ET MONTRANT L'IMPACT DE L'ALUMINIUM ET DE DIVERS FACTEURS PROTECTEURS SUR LES PARAMETRES SPERMATIQUES. IL FAUT NOTER QUE DANS CHAQUE ETUDE L'ENSEMBLE DES PARAMETRES ETUDIES EST ALTERE PAR LA PRESENCE D'ALUMINIUM.

Les études menées par d'autres équipes permettent toutefois de confirmer certains des résultats retrouvés par ces chercheurs égyptiens.

Il semble en particulier que l'aluminium soit responsable d'une augmentation de la production des radicaux libres au niveau testiculaire <sup>140</sup> avec une augmentation de l'activité des enzymes pro-oxydantes <sup>141</sup> et une réduction de l'activité des enzymes anti-oxydantes (réductase, glutathion peroxydase) <sup>142</sup>. Cette élévation du stress oxydant semble toutefois régressive après l'arrêt de l'exposition <sup>143</sup>

L'aluminium pourrait également jouer le rôle de perturbateur endocrinien en diminuant la synthèse de testostérone<sup>144</sup>, celle-ci serait à l'origine d'une diminution de la libido des animaux exposés<sup>145</sup>. Ces effets ne sont toutefois pas retrouvés dans toutes les études<sup>146</sup>.

Les atteintes histologiques sont également retrouvées dans de nombreuses études, il s'agit en particuliers de nécrose tubulaire (Figure 21)<sup>145,147</sup>, de réduction de l'épaisseur du tube séminifère avec diminution du nombre de cellules intra-tubulaires qu'elles soient germinales ou somatiques<sup>141,148</sup> et d'hyperplasie des cellules de Leydig (Figure 22). Là encore ces atteintes histologiques ne sont pas retrouvées dans toutes les études<sup>149</sup>. Une étude a également analysé les anomalies histologiques en microscopie électronique et a retrouvé dans les cellules de Sertoli un élargissement des mitochondries, une augmentation des lysosomes, une diminution des ribosomes et des irrégularités de la membrane nucléaire ; et dans les spermatocytes : une augmentation du volume du réticulum endoplasmique<sup>136</sup>. Un point important à remarquer est qu'il n'est précisé dans aucune des études si les analyses histologiques ont été effectuées en aveugle. La connaissance du groupe auquel appartient les animaux risque fortement d'induire un biais d'évaluation rendant peu fiables ces analyses histologiques.

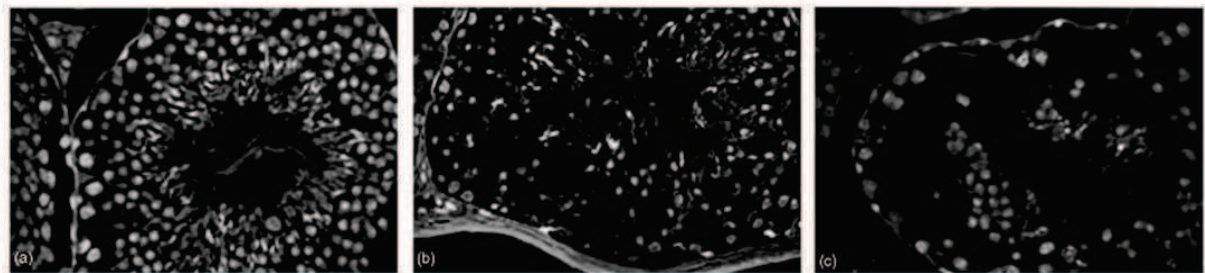


FIGURE 21 : IMAGES DE MICROSCOPIE OPTIQUE MONTRANT DES TESTICULES DE SOURIS NON EXPOSEES (A : STRUCTURE NORMALE) OU EXPOSEES A 13 MG/KG DE CHLORURE D'ALUMINIUM OBSERVEES APRES 2 SEMAINES (B : DOMMAGES MODERES) OU APRES 5 SEMAINES (C : IMPORTANTE PERTE CELLULAIRE). GROSSISSEMENT X264.

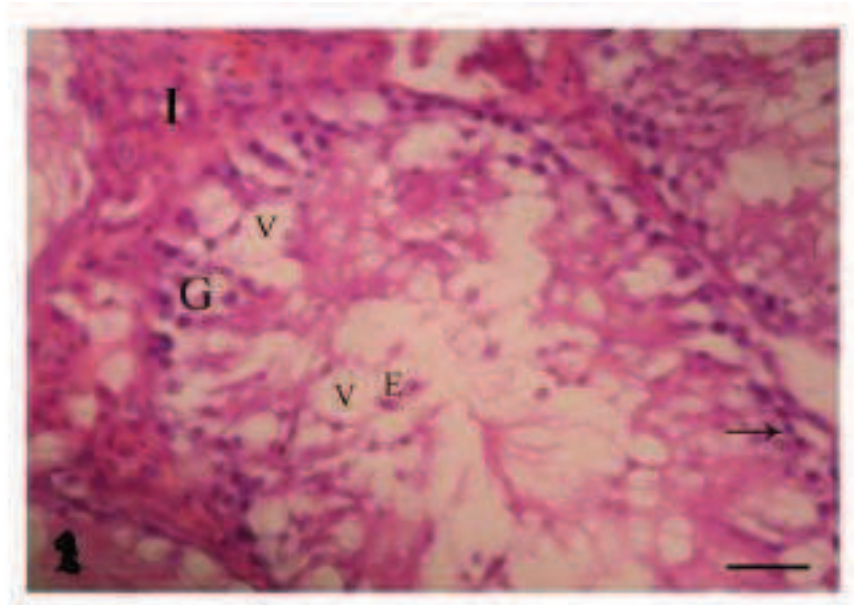


FIGURE 22 : IMAGE DE MICROSCOPIE OPTIQUE MONTRANT UNE COUPE DE TESTICULE DE RAT EXPOSE A DU CHLORURE D'ALUMINIUM PAR VOIE ORALE (34 MG/KG/J) PENDANT 70 JOURS. ON NOTE LA PRESENCE DE CELLULES GERMINALES EXFOLIEES (E), D'UNE HYPERPLASIE DES CELLULES DE LEYDIG (I), DE VACUOLES DANS L'EPITHELIUM SEMINIFERE (V). HEMATOXYLINE-EOSINE (X 400).

L'atteinte des caractéristiques spermatiques est quant à elle très variable d'une étude à l'autre. Dans l'étude de Llobet *et al.* seule la numération est affectée<sup>147</sup>, dans d'autres études la numération et la mobilité sont affectées<sup>141,148</sup>, une atteinte de la morphologie n'est quant à elle retrouvée que dans les études égyptiennes et l'étude de Zhu *et al.* qui elle aussi est sujette à caution du fait d'une dichotomie nette entre des résultats alarmants et une incapacité des auteurs à en trouver une explication scientifiquement acceptable<sup>150</sup>. Certaines études enfin ne retrouvent aucune influence de l'aluminium sur les paramètres spermatiques<sup>149</sup>. L'atteinte des annexes<sup>148</sup> et en particulier de l'épididyme<sup>149</sup> est également relevée par certains auteurs.

A la différence des études sur l'animal, les études sur l'homme sont quant à elles beaucoup moins nombreuses, on en compte essentiellement deux :

- L'étude de Hovatta retrouve une quantité abondante d'aluminium dans le sperme (1.93 +/- 3.37 mg/k), y compris chez des sujets qui n'ont a priori aucun risque d'exposition professionnelle<sup>151</sup>. Les variations interindividuelles sont importantes avec des facteurs allant au-delà de 200. Ayant séparé les spermatozoïdes du plasma séminal, les auteurs montrent que l'aluminium semble s'accumuler d'avantage au sein des spermatozoïdes eux-mêmes, affectant leur mobilité et leur morphologie mais pas leur numération. En revanche, aucune corrélation n'est retrouvée entre la quantité d'aluminium dans le plasma séminal et les paramètres spermatiques.

- L'étude de Dawson est assez similaire mais ne s'intéresse qu'à la mobilité spermatique<sup>152</sup>. Les concentrations retrouvées dans le plasma séminal sont inférieures à celles retrouvées dans l'étude d'Hovatta (101.0 +/- 36.0 µg/kg contre 0.74 +/- 1.00 mg/kg). Ils montrent qu'en moyenne la quantité d'aluminium est plus élevée dans le plasma séminal des patients présentant une faible mobilité spermatique.

## 6 DETECTION DES ELEMENTS CHIMIQUES ET DES NANOPARTICULES DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

Dans ce chapitre nous décrivons en premier lieu les techniques, qui lors de nos travaux, ont été mises en œuvre afin de détecter les éléments chimiques et les nanoparticules au sein des échantillons biologiques que nous avons analysés. Dans une seconde partie, nous discuterons, sous la forme d'une revue de la littérature, des difficultés techniques inhérentes à la recherche de nanoparticules dans les prélèvements biologiques d'origine humaine.

### 6.1 TECHNIQUES DE DETECTION DES ELEMENTS CHIMIQUES.

#### 6.1.1 SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (SAA)

La SAA est une méthode permettant de doser les éléments en solution et plus particulièrement les métaux<sup>153,154</sup>. Cette méthode d'analyse élémentaire impose que la mesure soit faite à partir d'un analyte (élément à doser) transformé à l'état d'atomes libres. Pour ce faire, l'échantillon est porté à une température de 2000 à 3000 degrés pour que les combinaisons chimiques dans lesquelles les éléments sont engagés soient détruites. Un faisceau lumineux de longueur d'onde spécifique est alors envoyé sur l'échantillon. Les photons absorbés étant caractéristiques des éléments absorbants, et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes absorbant, l'absorption permet de mesurer les concentrations des éléments à doser.

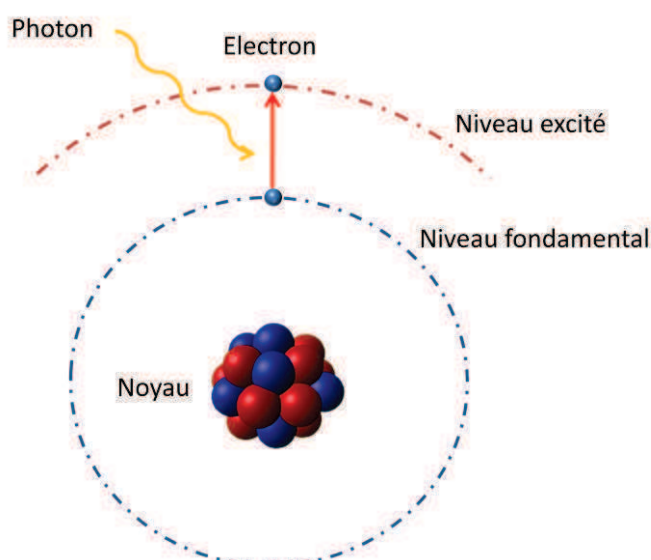


FIGURE 23 : ATOME PASSANT D'UN ETAT FONDAMENTAL A UN ETAT EXCITE PAR ABSORPTION D'UN PHOTON A LONGUEUR D'ONDE SPECIFIQUE. SOURCE DE L'IMAGE DU NOYAU : WWW.EMILANGUES.EDUCATION.FR.

Le spectromètre d'absorption atomique associe les dispositifs suivants (voir Figure 24) :

- Une source de photons : le plus souvent il s'agit d'une lampe à cathode creuse. Afin d'émettre un rayonnement de la longueur d'onde appropriée, elle doit être constituée de l'élément que l'on souhaite doser. Elle se positionne dans une enceinte contenant un gaz rare. Le passage d'un courant électrique ionise le gaz rare qui par bombardement ionique va arracher des atomes à la cathode et les exciter. En retrouvant une forme non excitée ils vont émettre des photons de la longueur d'onde spécifique de l'élément à doser. Ceci implique toutefois une source différente pour chaque élément à doser.
- Un nébuliseur : son rôle est de vaporiser l'échantillon à doser vers la flamme sous la forme d'un aérosol à fines gouttelettes.
- Une flamme : il s'agit le plus souvent d'une flamme air acétylène capable de chauffer les échantillons à 2500°C. Elle peut être remplacée par un four cylindrique en graphite. Elle sert à atomiser les échantillons.
- Un monochromateur : il peut s'agir de prismes, de filtres ou d'interféromètres. Ils servent à éliminer le rayonnement lumineux qui ne correspond pas à la longueur d'onde d'absorption de l'élément étudié.
- Un détecteur : il transforme le rayonnement lumineux en signal électrique retranscrit sur un ordinateur. Il est le plus souvent associé à un photomultiplicateur qui permet d'éliminer le bruit de fond issu de la lumière émise par la flamme ou par l'environnement du laboratoire.

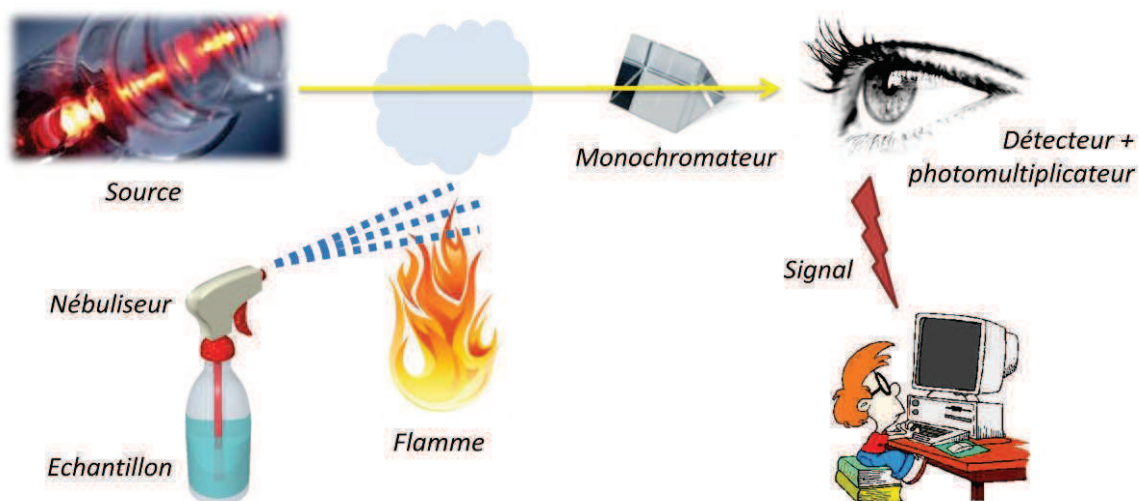


FIGURE 24 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN APPAREILLAGE D'UN SPECTROMETRE D'ABSORPTION ATOMIQUE. SOURCES : WWW.3BSCIENTIFIC.FR, WWW.CLIPART-GIF.COM, WWW.HERAEUS-NOBLELIGHT.COM, WWW.VOIRON.NET, FR.FREEPIK.COM ET WWW.FRANCETOP.NET.



### 6.1.2 INDUCTIVELY COUPLED PLASMA AND ATOMIC EMISSION SPECTROSCOPY (ICP-AES)

L'ICP-AES est une technique d'analyse permettant de connaître la composition élémentaire d'un échantillon, son principe est opposé à celui de la SAA<sup>155,156</sup>.

La méthode consiste à désintégrer puis à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon (gaz atomique chargé formé d'un mélange d'ions et d'électrons) formant une flamme atteignant des températures de l'ordre de 8 000°Kelvin. Le plasma d'argon est obtenu en introduisant un courant d'argon dans une torche constituée de trois cylindres en quartz concentriques (Figure 25). Ces cylindres délimitent trois entrées : la plus périphérique permet d'amener le gaz plasmagène à l'origine de la formation du plasma, l'entrée intermédiaire apporte le gaz auxiliaire qui positionne le plasma par rapport à l'injecteur, l'entrée centrale constitue l'injecteur, elle apporte le gaz de nébulisation qui transporte l'échantillon vers le plasma. Autour de la torche est enroulé un tuyau de cuivre refroidi par une circulation d'eau. La bobine ainsi formée (spire d'induction) est raccordée à un générateur de radiofréquences produisant un champ magnétique qui confine les ions et les électrons d'argon sur un parcours annulaire (courant de Foucault). L'ionisation est déclenchée par une décharge électrique et entretenue par la circulation des électrons et cations d'argon sous l'influence du champ magnétique. Le milieu devient alors de plus en plus conducteur et s'échauffe considérablement par effet Joule.

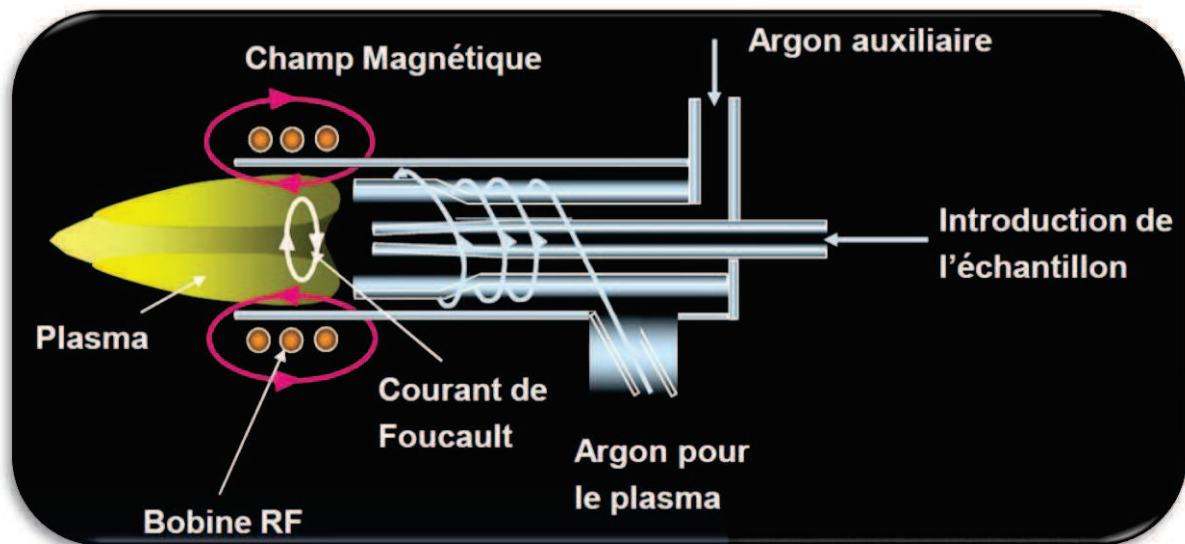


FIGURE 25 : SCHEMA D'UNE TORCHE A PLASMA. SOURCE : DIDEL.SCRIPT.UNIV-PARIS-DIDEROT.FR



L'échantillon sous forme liquide est introduit dans le plasma sous la forme d'un fin aérosol généré par un nébuliseur. Il est alors désintégré et en partie ionisé. Les éléments constitutifs de l'échantillon passent alors successivement d'un état excité à un état stable et inversement au gré des gains et des pertes d'énergie qu'ils subissent. Le passage d'une forme excitée à une forme plus stable entraîne l'émission d'un photon dont la longueur d'onde est caractéristique de l'élément considéré (Figure 26). A l'aide d'un prisme permettant de trier les photons de différentes longueurs d'ondes et d'un photomultiplicateur permettant d'amplifier le signal, il est possible de mesurer le nombre de photons émis pour chaque longueur d'onde d'intérêt et ainsi de reconstituer la composition élémentaire de l'échantillon.

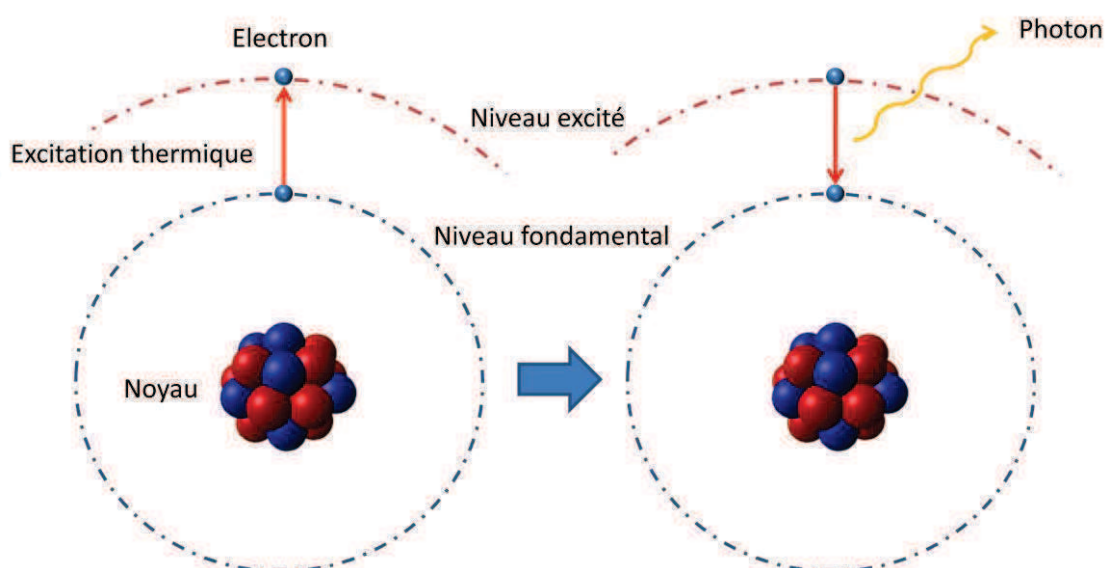


FIGURE 26 : ATOME PASSANT D'UN ETAT EXCITE A UN ETAT FONDAMENTAL PAR EMISSION D'UN PHOTON A LONGUEUR D'ONDE SPECIFIQUE. SOURCE DE L'IMAGE DU NOYAU : WWW.EMILANGUES.EDUCATION.FR.

Ce qui différencie la SAA est l'ICP-AES est essentiellement l'état d'excitation des atomes après désintégration de l'échantillon. L'élévation de température réalisée lors de la SAA ne permet qu'une dissociation des atomes, la majorité d'entre eux restent dans un état non excité leur permettant d'absorber les photons du faisceau lumineux avec lequel ils sont éclairés. A l'inverse les atomes passant dans la torche à plasma de l'ICP-AES seront pour la plupart dans un état excité et émettront des photons de longueur d'onde spécifique pour retourner à un état d'énergie basal. Pour l'ICP-AES comme pour la SAA, une courbe d'étalonnage faite à partir des éléments à doser doit être réalisée dans une matrice aussi proche que possible de celle de l'échantillon à analyser.

## 6.2 TECHNIQUES DE DETECTION DES NANOPARTICULES.

### 6.2.1 LA DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS : Diffusion Light Scattering) est une technique d'analyse permettant d'évaluer la quantité et la taille de très petites particules (1 à 5000 nm) en suspension dans un liquide<sup>157</sup>.

Le principe est d'envoyer un rayonnement lumineux intense, produit par un laser, sur un milieu liquide transparent contenant ces petites particules. La lumière va alors être diffusée de façon élastique, c'est à dire sans perte d'énergie, dans toutes les directions de l'espace. Lorsque la taille des particules est très inférieure à celle de la longueur d'onde de la lumière diffusée, ce phénomène prend le nom de diffusion de Rayleigh. Un détecteur est placé à un angle défini par rapport au faisceau incident, le plus souvent 90°, et va enregistrer le signal de la lumière diffusée. Plus il y a de particules dans le milieu et plus le signal enregistré est important (Figure 27).

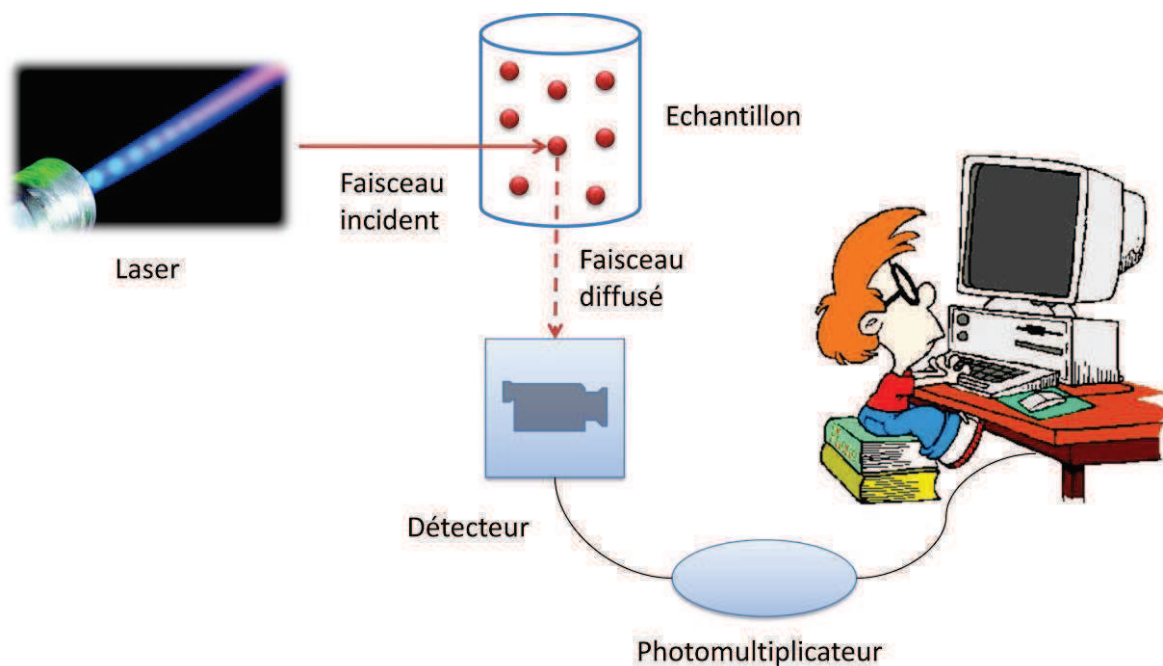


FIGURE 27 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN APPAREILLAGE DE DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE. SOURCES DES IMAGES : WWW.MOTEURNATURE.COM ET WWW.FRANCETOP.NET.

En enregistrant ce signal sur la durée, il est possible de mesurer des variations de son intensité. Ces variations sont liées au mouvement brownien des particules qui crée des interférences sur l'enregistrement du signal. Ce mouvement est imprimé par les impacts des molécules du milieu qui se déplacent du fait de l'agitation thermique. Plus les particules sont petites, plus leur déplacement

sera rapide et plus les variations d'intensité du signal seront fréquentes (Figure 28). A partir de ces variations il est possible de reconstruire une fonction d'auto corrélation du signal. La vitesse de décroissance de cette auto corrélation est liée au rayon hydrodynamique des particules par la loi de Stokes-Einstein. Ainsi, une faible auto corrélation montre que les particules se déplacent rapidement et qu'elles sont donc de petite taille (Figure 29).

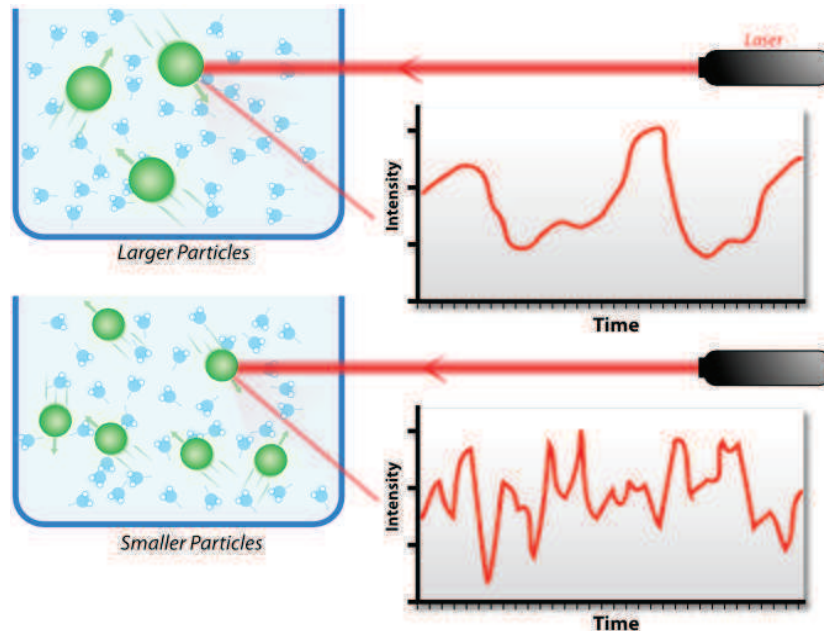


FIGURE 28 : ILLUSTRATION DES VARIATIONS D'INTENSITE DE SIGNAL OBTENU EN DLS AU COURS DU TEMPS EN FONCTION DE LA TAILLE DES PARTICULES. L'INTENSITE DIFFUSEE PAR DES GROSSES PARTICULES (MOINS MOBILES) VARIE MOINS VITE QUE POUR DES PETITES PARTICULES. SOURCE : FR.WIKIPEDIA.ORG.

Il est à noter que cette fonction permet d'obtenir le rayon hydrodynamique, c'est-à-dire le rayon de la particule brute observée en microscopie électronique, additionné de toutes les molécules qui sont adsorbées à sa surface. De plus, si la particule n'est pas sphérique, le rayon observé sera celui d'une particule sphérique ayant le même coefficient de diffusion de la lumière que la particule observée. Ceci conduit souvent à une légère surestimation de la taille des particules.

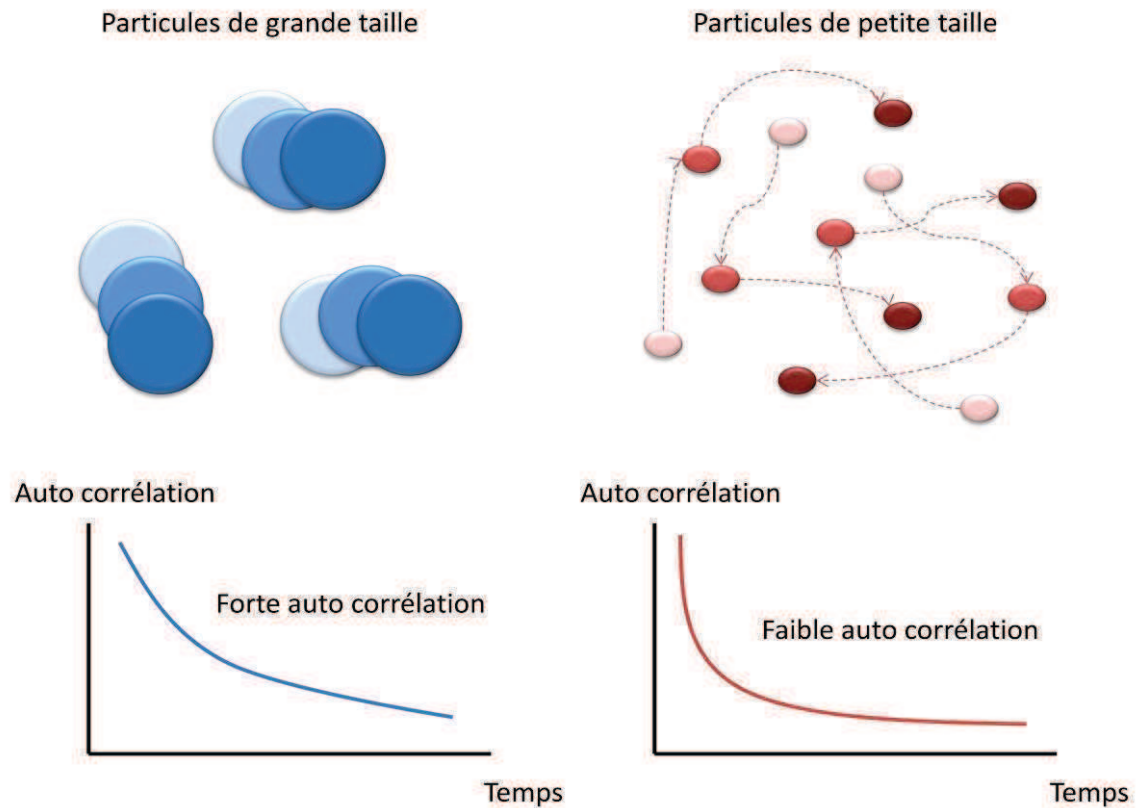


FIGURE 29 : EN DLS, LA COURBE D'AUTO CORRELATION CREEE A PARTIR DES VARIATIONS D'INTENSITE DU SIGNAL PERMET D'OBTENIR DES INFORMATIONS SUR LE MOUVEMENT DES PARTICULES ET AINSI D'EN DEDUIRE LEUR TAILLE.

### 6.2.2 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)

La Microscopie Electronique à Balayage permet l'observation à très fort grossissement de la topographie des surfaces (jusqu'à 100 000 fois contre 1500 fois en microscopie optique). Son pouvoir séparateur est souvent inférieur à 5 nm<sup>158</sup>.

Son principe est de balayer un échantillon à l'aide d'un fin faisceau d'électrons. L'interaction entre les électrons et la matière est à l'origine de différentes émissions dont l'analyse permet la reconstitution d'une image (Figure 30) :

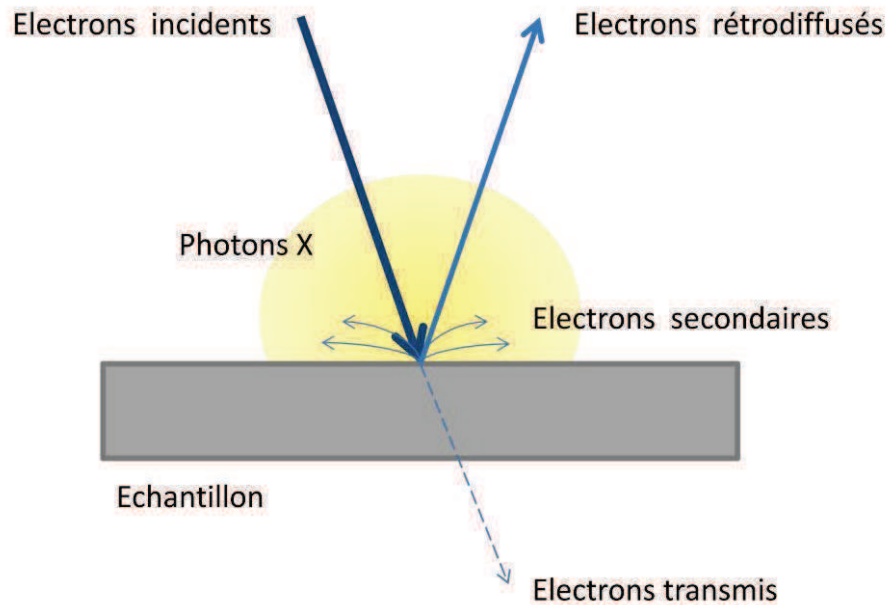


FIGURE 30 : SCHEMA REPRESENTANT LES DIFFERENTES EMISSIONS OBSERVABLES EN MEB.

- L'émission électronique secondaire résulte essentiellement de l'éjection d'électrons arrachés aux atomes de l'échantillon après interaction inélastique avec un électron incident. Ils ont une énergie faible, par convention inférieure à 50 eV. De ce fait, ils sont incapables de traverser la matière et sont donc essentiellement issus des atomes de surface touchés par le faisceau incident, ils sont très sensibles à la topographie de surface et sont facilement déviés par des champs électriques extérieurs ce qui permet de les orienter vers un détecteur. Par ailleurs l'intensité de leur émission est maximale en incidence rasante (Figure 31). C'est l'émission électronique secondaire qui est utilisée pour former l'image en microscopie électronique à balayage, leur faible capacité à voyager au-delà de leur zone de création est à l'origine de l'excellent pouvoir séparateur de la microscopie électronique à balayage.
- L'émission électronique rétrodiffusée est secondaire à l'interaction élastique entre les électrons primaires et les noyaux atomiques (en simplifiant, il s'agit d'électrons incidents qui rebondissent sur l'échantillon). Ces électrons ont en général une énergie importante et une trajectoire rectiligne peu affectée par les faibles champs électriques extérieurs et capable de traverser une quantité de matière plus importante que les électrons secondaires. Leur existence dépend essentiellement de la masse des noyaux avec lesquels le faisceau incident interagit, plus cette masse est élevée, plus le nombre d'électron rétrodiffusé sera important. Du fait de leur forte énergie et donc de leur grande capacité à voyager ils fournissent des images à faible résolution mais ils permettent d'obtenir un contraste sur la composition élémentaire de l'échantillon et



sont donc intéressants pour détecter des particules constituées d'éléments lourds dans une matrice légère (ex : milieux biologiques).

- Le faisceau électronique transmis, très important en microscopie électronique à transmission n'a que très peu d'intérêt en microscopie électronique à balayage.
- L'émission de rayons X survient lorsqu'un électron incident arrache un électron secondaire au niveau du cœur d'un atome par interaction inélastique. Un réarrangement des électrons de surface a alors lieu pour combler la lacune ainsi créée. Cette transition électronique est à l'origine d'une libération d'énergie sous la forme d'un photon X. L'énergie ainsi émise est caractéristique de la nature de l'atome qui l'émet. A l'aide d'un capteur de photons il est donc possible d'analyser la composition chimique de la surface d'un échantillon. Cette analyse X a une résolution de l'ordre du  $\mu\text{m}^3$ .

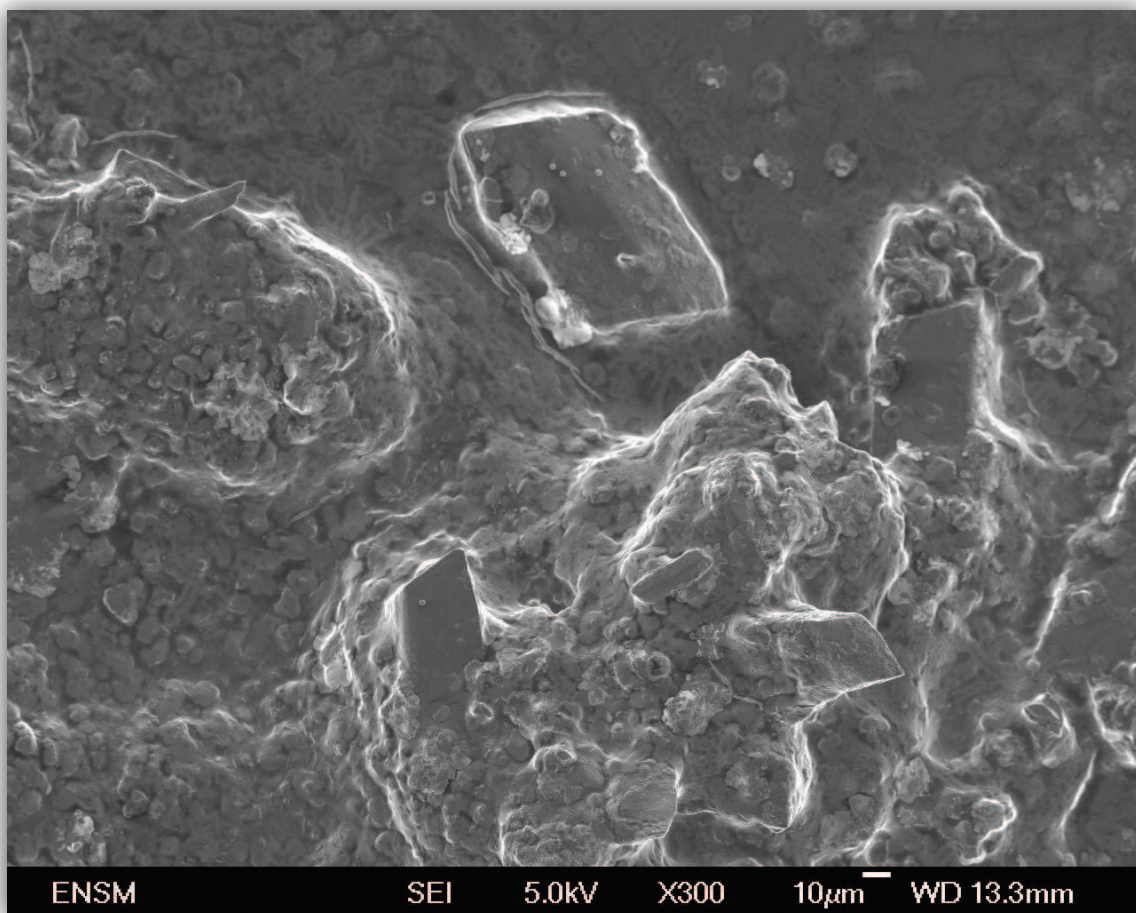


FIGURE 31 : IMAGE D'UN PLASMA SEMINAL EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BLAYAGE. LES ZONES TANGENTIELLES AU FAISCEAU INCIDENT EMETTENT UN SIGNAL TRES INTENSE.

Ainsi, un microscope électronique à balayage sera au minimum constitué d'une source et d'un accélérateur d'électrons, d'une colonne maintenue sous un vide suffisant afin d'éviter l'interaction

des électrons avec les atomes de l'air, d'un ensemble de lentille électronique et d'un condenseur final permettant de créer un faisceau fin et de le focaliser sur la surface à étudier, d'un dispositif de déflection piloté par un générateur de balayage, d'une platine porte-objet, d'un détecteur d'électrons secondaires avec amplificateur de signal et d'un système de visualisation d'images (Figure 32).

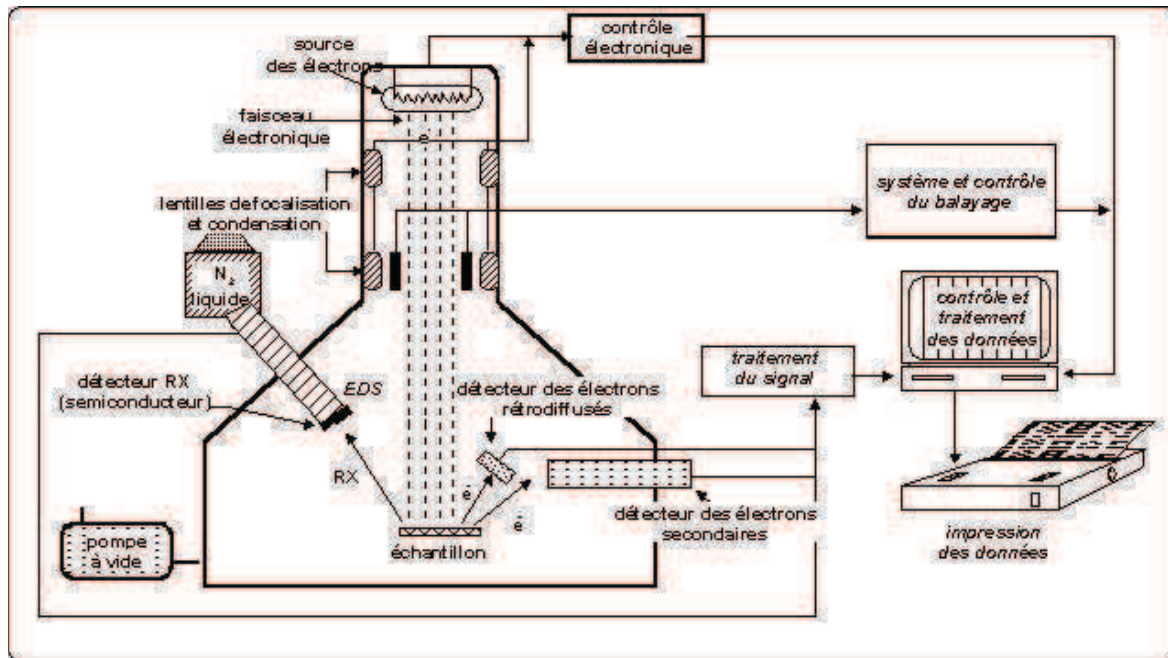


FIGURE 32 : SCHEMA D'UN MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE. SOURCE : WWW.LRMH.FR.

Du fait du vide poussé qui réside au niveau de la chambre d'analyse les échantillons biologiques doivent être déshydratés et fixés, ils doivent ensuite être nettoyés afin d'éliminer les impuretés de surface puis métallisés afin de les rendre conducteurs, condition indispensable à toute analyse en microscopie électronique à balayage.

L'image est formée en modulant point par point la brillance de l'écran d'observation par l'intensité du signal issu du détecteur d'électrons secondaires et selon un balayage synchrone avec celui de l'échantillon. Afin d'éliminer le « bruit » parasite de l'image il est possible d'accumuler les balayages successifs. Procéder de cette façon est plus efficace et moins délétère pour l'échantillon que d'allonger la durée d'un balayage unique. Le grandissement est quant à lui défini par le rapport entre la dimension de la plage balayée sur l'écran (qui est fixe) et celle de la plage balayée sur l'échantillon (qui est variable).

### 6.2.3 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION (MET)

La microscopie électronique en transmission utilise un principe similaire à la microscopie électronique à balayage mais dans ce cas c'est le faisceau électronique transmis qui est étudié<sup>159</sup>. Pour ce faire un canon à électron émet un faisceau électronique qui est focalisé sur l'objet à observer



à l'aide de lentilles électromagnétiques dans une enceinte où règne un vide poussé pour éviter tout parasitage du faisceau. L'échantillon, préparé en coupes fines et déposé sur une grille métallique, retient un certain nombre de ces électrons. Les électrons transmis au travers des zones les moins denses de l'échantillon sont captés par un écran qui convertit le signal électrique en image (Figure 33).

La résolution atteinte par microscope électronique est bien supérieure à celle obtenue en microscopie photonique. En effet, le pouvoir de résolution d'un microscope, c'est-à-dire la plus petite distance observable entre deux points ( $d$ ), est défini par la longueur d'onde du faisceau ( $\lambda$ ) qui éclaire l'objet et l'ouverture numérique (NA) du microscope selon la formule suivante :

$$d \approx \frac{\lambda}{2NA}$$

La longueur d'onde du rayonnement électronique émis par le canon à électron est d'autant plus petite que l'énergie des électrons est grande. Ainsi, un canon à électron capable d'émettre des électrons ayant une grande énergie permet l'obtention d'un faisceau électronique incident présentant une très petite longueur d'onde. La résolution d'un microscope électronique pourrait atteindre théoriquement le picomètre dans le cas d'un faisceau d'une puissance de 100 KeV. En pratique les aberrations géométriques, chromatiques ou de charge d'espace limitent cette résolution à environ 0,1 nm. Cette importante résolution a malgré tout un prix. En effet la microscopie électronique nécessite une longue préparation des échantillons et le volume d'échantillon étudié est très limité.

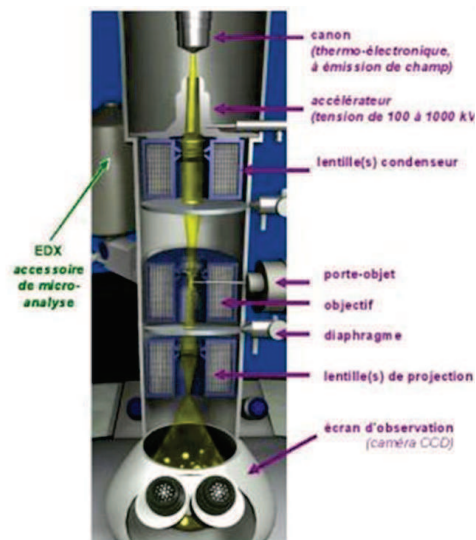


FIGURE 33 : SCHEMA D'UN MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION. SOURCE : [HTTP://WWW.IRCELYON.UNIV-LYON1.FR](http://www.ircelyon.univ-lyon1.fr)

#### 6.2.4 MICROANALYSE X

La microanalyse X est une technique associée à la MEB ou à la MET, elle permet de déterminer la composition élémentaire de l'objet observé en captant les photons émis lors de la transition élémentaire d'un électron de haute énergie vers un niveau de plus basse énergie. Cette transition survient après qu'un électron secondaire ait été arraché par le faisceau incident d'un niveau électronique proche du noyau laissant un espace qui sera comblé par un électron d'un niveau supérieur. Le photon ainsi émis a une longueur d'onde caractéristique de l'atome dans lequel a eu lieu la transition. Les photons voyageant facilement à travers l'échantillon, le pouvoir de résolution de l'analyse X est bien inférieur à celle de la MEB ou de la MET.

### 6.3 APPLICATION A LA DETECTION DES NANOPARTICULES DANS LES TISSUS ET LIQUIDES BIOLOGIQUES HUMAINS, LIMITES ET PERSPECTIVES

La détection des particules dans les tissus et liquides biologiques humains est à l'heure actuelle une tâche particulièrement complexe. Cette difficulté représente un obstacle réel à une meilleure compréhension de la toxicité potentielle des nanoparticules. Les techniques actuelles se heurtent à plusieurs écueils :

- **La petite taille des particules** : les techniques de microscopie optiques qu'elles soient classiques ou à fluorescence ont une résolution de l'ordre du  $\mu\text{m}$ . Ceci rend impossible leur utilisation dans le cadre de la détection de nanoparticules uniques. Seule la microscopie électronique ou les nouvelles techniques de microscopie optique à haute résolution sont envisageables dans ce contexte.
- **La faible quantité de particules dans les milieux** : dans le cadre d'une recherche des particules dans les milieux biologiques humains, la faible quantité de particules potentiellement présente est également un frein. En effet, les techniques à fort pouvoir de résolution telles que la microscopie électronique ont une faible sensibilité puisqu'il faut un nombre important de particules dans le liquide ou le tissu pour avoir une chance raisonnable de les observer. Les techniques de détection des éléments (SAA, ICP-AES et ICP-MS) ont une bonne sensibilité mais l'information sur le caractère particulière de l'élément retrouvé est perdue lors de l'analyse de l'échantillon. Une solution serait l'utilisation de techniques de pointes telles que la SP-ICP-MS (Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) qui permet la détection de particules uniques et l'analyse de leur composition élémentaire mais celle-ci est encore peu accessible.

- **Les interactions entre les particules et milieu :** du fait de leur importante surface spécifique les nanoparticules sont fortement capables d'interagir avec le milieu biologique dans lequel elles se trouvent. Ces interactions sont susceptibles de modifier leur charge de surface, d'entraîner leur agglomération, de les piéger au sein de structures biologiques dont il peut être difficile de les extraire sans les dénaturer ou enfin d'entraîner leur altération voir leur dissolution. Toutes ces modifications qui sont parfois difficiles à envisager à priori rendent leur détection d'autant plus complexe.

Tous ces problèmes ont déjà été soulevés dans plusieurs revues de la littérature extrêmement bien conduites<sup>160,161</sup>. Toutefois, les solutions proposées restent malheureusement insuffisantes ou nécessitent du matériel de pointe difficilement accessible<sup>162</sup>. Dans la revue qui va suivre nous nous intéressons plus spécifiquement aux études ayant recherché des nanoparticules dans les milieux biologiques humains et nous proposons des solutions pour surmonter les obstacles précédemment cités.

Manuscript Number: jbmt33519

Title: Detection and analysis of nanoparticles in patients: a critical review of the status quo of clinical nanotoxicology

Article Type: REV Review

Section/Category: Biomaterials Design and Medical Device Performance (BMD)

Keywords: clinical, nanotoxicology, nanoparticles, analysis, qualitative, quantitative

Corresponding Author: Mr. Dimitrios Bitounis,

Corresponding Author's Institution: University of Lyon

First Author: Dimitrios Bitounis

Order of Authors: Dimitrios Bitounis; Jérémie Pourchez; Valérie Forest; Delphine Boudard; Michèle Cottier; Jean-Philippe Klein

**Abstract:** On the cusp of massive commercialization of nanotechnology-enhanced products and services, the physical and chemical analysis of nanoparticles in human specimens merits immediate attention from the research community as a prerequisite for a confident clinical interpretation of their occurrence in the human organism.

In this review, we describe the caveats in current practices of extracting and isolating nanoparticles from clinical samples and show that they do not help truly define the clinical significance of any detected exogenous nano-sized objects. Finally, we suggest a systematic way of tackling these demanding scientific tasks.

More specifically, a precise and true qualitative evaluation of nanoparticles in human biological samples still remains difficult to achieve because of various technical reasons. Such a procedure is more refined when the nature of the pollutants is known, like in the case of nano-sized wear debris originating from biomedical prostheses. Nevertheless, nearly all available analytical methods provide unknown quantitative accuracy and qualitative precision due to the challenging physical and chemical nature of nanoparticles.

Without trustworthy information to detect and describe the nanoparticulate load of clinical samples, it is impossible to accurately assess its pathological impact on isolated cases or allow for relevant epidemiological surveys on large populations. Therefore, we suggest that the many and various specimens stored in hospitals be used for the refinement of methods of exhaustive quantitative and qualitative characterization of prominent nanoparticles in complex human milieu.

Cover Letter

[Click here to download Cover Letter: BM\\_coverletter.docx](#)

Dimitrios Bitounis  
Université de Lyon, Université Jean Monnet  
10 rue de la Marandière, 42270, Saint Priest en Jarez, France  
+33 6 23 55 31 38  
bitounis@emse.fr

Prof. K.W. Leong  
Editor-in-Chief  
Biomaterials

May 13, 2015

Dear Prof. K.W. Leong:

I hereby would like to submit a review entitled “**Detection and analysis of nanoparticles in patients: a critical review of the status quo of clinical nanotoxicology**” for consideration of publication in Biomaterials.

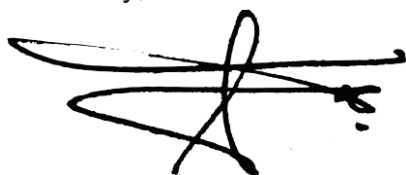
This manuscript is centered around all published clinical cases of patients whose samples contained exogenous nanoparticulate matter. A careful inspection of practiced methods of detection and characterization of nanoparticles in human clinical samples revealed that they do not always allow for the adequate evaluation of the particles’ impact on patients. This review is poised for publication in Biomaterials as it highlights the caveats in analyzing potentially pathogenic nanoparticles generated from the fretting of biomedical implants as well as other artificial particles in human samples.

We feel that with this work we draw attention to current problems of clinical nanotoxicology which are bound to become more urgent along with the large-scale use of nanoparticles.

This manuscript has not been published nor is it under consideration for publication elsewhere. Finally, all permissions for the reuse of third-party figures have already been acquired and we have no conflicts of interest to declare.

Thank you for your consideration.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Dimitrios Bitounis', written in a cursive style with a large loop at the end.

Dimitrios Bitounis  
LINA EA 4624  
Université de Lyon, Université Jean Monnet

1 **Detection and analysis of nanoparticles in patients: a critical review of the status quo of**  
2 **clinical nanotoxicology**

3  
4  
5  
6  
7 4 Dimitrios Bitounis<sup>1</sup>, Jérémie Pourchez<sup>2</sup>, Valérie Forest<sup>2</sup>, Delphine Boudard<sup>1</sup>, Michèle Cottier<sup>1</sup>  
8  
9 and Jean-Philippe Klein<sup>1</sup>

10  
11  
12  
13  
14 7 <sup>1</sup>Université de Lyon, Université Jean Monnet, EA 4624 LINA, 10 rue de la Marandière,  
15  
16  
17 8 42270, Saint Priest en Jarez, France

18  
19 9 <sup>2</sup>Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, F42023 158 Cours Fauriel CS62362,  
20  
21  
22 10 Saint-Etienne, France

23  
24  
25  
26 12 Corresponding author: Dimitrios Bitounis

27  
28  
29 13 Address: Faculté de Médecine, 10 rue de la Marandière, 42270, Saint Priest en Jarez, France

30  
31 14 Email: [dimitrios.bitounis@univ-st-etienne.fr](mailto:dimitrios.bitounis@univ-st-etienne.fr)

32  
33  
34 15 Mobile: +33 6 23 55 31 38 158

35  
36  
37  
38  
39 17 Keywords: clinical, nanotoxicology, nanoparticles, analysis, qualitative, quantitative

26 **Abstract**

27 On the cusp of massive commercialization of nanotechnology-enhanced products and  
28 services, the physical and chemical analysis of nanoparticles in human specimens merits im-  
29 mediate attention from the research community as a prerequisite for a confident clinical in-  
30 terpretation of their occurrence in the human organism.

31 In this review, we describe the caveats in current practices of extracting and isolating  
32 nanoparticles from clinical samples and show that they do not help truly define the clinical  
33 significance of any detected exogenous nano-sized objects. Finally, we suggest a systematic  
34 way of tackling these demanding scientific tasks.

35 More specifically, a precise and true qualitative evaluation of nanoparticles in human  
36 biological samples still remains difficult to achieve because of various technical reasons.  
37 Such a procedure is more refined when the nature of the pollutants is known, like in the case  
38 of nano-sized wear debris originating from biomedical prostheses. Nevertheless, nearly all  
39 available analytical methods provide unknown quantitative accuracy and qualitative precision  
40 due to the challenging physical and chemical nature of nanoparticles.

41 Without trustworthy information to detect and describe the nanoparticulate load of clinical  
42 samples, it is impossible to accurately assess its pathological impact on isolated cases or al-  
43 low for relevant epidemiological surveys on large populations. Therefore, we suggest that the  
44 many and various specimens stored in hospitals be used for the refinement of methods of ex-  
45 haustive quantitative and qualitative characterization of prominent nanoparticles in complex  
46 human milieu.

47

48



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

49 **Table of Contents**

50 **Exogenous, nano-sized findings in human patients: a review of their physicochemical**

51 **analyses and medical interpretation..... Error! Bookmark not defined.**

52 **Introduction.....4**

53 **Scope and purpose of the review .....5**

54 **Nano-sized wear debris in periprosthetic tissues .....6**

55 **Clinical relevance .....7**

56 **Extraction and analysis of nano-sized wear debris from periprosthetic samples.....8**

57 **Standard practices .....10**

58 **Nanoparticles in samples of patients suffering from idiopathic diseases.....11**

59 **Clinical relevance of detected nanoparticles .....12**

60 ***Ex vivo* exploration of the nanoparticulate load of clinical samples .....15**

61 **Discussion of methodological caveats and relevant suggestions .....17**

62 **Quantitative extraction of nano-sized wear debris .....17**

63 **Qualitative characterization of nano-sized wear debris.....19**

64 **The potential role of the nanoparticles’ biological coating .....20**

65 **Challenges during the investigation of clinical samples for unknown nano-sized**

66 **objects.....21**

67 **Conclusions.....23**

68 **Declaration of interest statement.....25**

69 **Bibliography .....26**

70

71

72

## 73 Introduction

74 The terminology used in the field of nanotechnology and associated subfields is under  
75 constant refinement. In 2011, the term “nanomaterial” was defined by the European Commis-  
76 sion (EC) as “*a natural, incidental or manufactured material containing particles [...] (of*  
77 *which) one or more external dimensions is in the size range 1nm - 100nm*” (Linsinger et al.,  
78 2012). In late 2014, feedback from various laboratories helped revise this recommendation  
79 based on how it integrated with the challenges in their fields of work. In the current review  
80 the term “nanoparticle” (NP) will be used to signify nano-sized pieces of matter, of either  
81 spherical or near-spherical, platelet, flake and fibrous shape as clarified by the EC in a recent-  
82 ly published JRC report (Roebben et al., 2014).

83 Over the past 15 years, it has become apparent that an unequivocal understanding of  
84 long-term repercussions on human health upon exposure to NP constitutes an almost inordi-  
85 nate task. One can argue that this is because of two reasons: first, NP are created with a high  
86 degree of physical and chemical variability; second, their properties may undergo alterations  
87 during their life-cycle. The physicochemical variety of nanoparticulate formulations and their  
88 unstable nature renders their most fundamental properties (surface chemistry, aggregation  
89 state, etc.) difficult to measure and hinders the evaluation of their effects on living organisms  
90 and the environment. Consequently, the toxicokinetics and toxicodynamics of NP are multi-  
91 parametric and prohibitively time-consuming to estimate. A study in 2009 suggested that it  
92 would require U.S. industries at least half a century to evaluate the toxicity of existing nano-  
93 particles at the pace such test used to be undergone (Chatterjee 2009). Under the current cir-  
94 cumstances, the industrial world is aiming for an *ad hoc* approach to ensure that nanomateri-  
95 als are manufactured in a way that does not endanger the employees’ safety nor puts public  
96 health and the environment at risk (Helland et al., 2008). In the past, though, chemical sub-  
97 stances and materials of industrial interest were regulated only after their detrimental ramifi-

98 cations had manifested in individuals, often as a result of high levels of occupational expo-  
99 sure. Of the most notorious examples are vinyl chloride, trichloroethylene and asbestos.

100 Asbestos is a thoroughly documented case, both toxicologically and epidemiological-  
101 ly. It is a naturally occurring, fibrous and crystalline material that enjoyed widespread use  
102 thanks to its interesting thermal and mechanical properties, until it was indisputably linked to  
103 an array of lung diseases. The most severe of them was pleural mesothelioma, a rare form of  
104 cancer of the mesothelial tissue that lines the lungs and the chest wall (Wagner et al., 1960).  
105 In fact, there have been so many afflicted patients, that links have been established between  
106 exposure levels to airborne asbestos fibers, their deposition to the lungs and an eventual de-  
107 velopment of asbestos-related diseases (Berman & Crump 2008). Although still under discus-  
108 sion, the onset of pathological conditions related to elevated asbestos exposure is believed to  
109 originate from the constant pro-inflammatory state brought upon the frustrated phagocytosis  
110 of its highly biopersistent fibers of more than 15-20µm long - what is now referred to as the  
111 “fibrous toxicity paradigm” (Schinwald et al., 2012). A similar pathogenic process has been  
112 proposed for the acute and chronic *in vivo* toxicity of long, thin, needle-like carbon nano-  
113 tubes, imputed to traits similar to asbestos fibers, like extensive crystallinity and high aspect  
114 ratio (Donaldson et al., 2010; Donaldson et al., 2013).

### 115 **Scope and purpose of the review**

116 Our contention is that the analysis of nanoparticles in human biological matrices is  
117 being overlooked and, on that ground, the purposes of this short review are to pinpoint the  
118 challenges of detecting and adequately characterizing the nanoparticulate load of human  
119 samples as well as highlight their clinical significance. To this end, we have considered pub-  
120 lished studies which dealt with the extraction of nanoparticles from human samples, proceed-  
121 ed with their quantitative and / or qualitative analysis and, finally, attempted an assessment of  
122 their clinical impact. Select animal or *in vitro* experiments are also referenced when pertinent

123 remarks can be made. Regarding the analysis of NP in environmental and biological systems  
124 from a purely technical standpoint, there is an in-depth report that aptly describes the caution  
125 required and the difficulties met when working with such intricate samples (von der Kammer  
126 et al., 2012). We have excluded from our scope studies that employed fluorescent or radio-  
127 labelled nanoparticles, as these are designed to be traceable and quantifiable by specific  
128 means that do not generally apply. The relevant literature has been stratified into two groups:  
129 the first one includes studies for which the origin as well as the physicochemical nature of the  
130 nano-objects was *a priori* assumed. From an analytical standpoint, such knowledge is crucial  
131 for the successful isolation and characterization of the analyte. Inversely, the second group is  
132 dedicated to studies where the presence of nanoparticles in the samples was investigated as a  
133 possible explanation of the patients' clinical condition. Obviously, such research is more lim-  
134 ited in terms of available technical tools and the medical interpretations of the findings are  
135 mostly conjectural.

### 137 **Nano-sized wear debris in periprosthetic tissues**

138 Orthopedic prostheses have been used for the past five decades to partially or com-  
139 pletely replace arthritic or otherwise traumatized joint surfaces. These biomedical devices are  
140 engineered to be durable and to withstand heavy loads of weight. To this end, preferred mate-  
141 rials are ultrahigh molecular weight polyethylene (UHMWPE), various metal alloys of mo-  
142 lybdenum, chromium, cobalt and titanium, and ceramics ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ , among others),  
143 all of which show good biocompatibility in their bulk form. Once implanted, these devices  
144 are being subject to continuous fretting which causes particulate debris to be released in the  
145 synovial cavities and to the periprosthetic tissues. As it was first verified for UHMWPE-  
146 based prostheses and later for other types of materials too, debris-induced inflammation can  
147 cause a loss of mechanical stability at the affected joint, a situation which sometimes requires

148 a revision surgery to be performed (Bozic et al., 2010). This section discusses the *ex vivo*  
149 studies on periprosthetic samples that investigated the contained nanoparticulate wear debris.

### 150 **Clinical relevance**

151 Regardless of the artificial bone's bulk materials, all types of debris have an inflam-  
152 matory effect at the site of the replaced joint and usually cause pain, discomfort and might  
153 eventually reduce the motility of the patient. The pathological mechanism triggered by  
154 UHMWPE particles results in the aseptic loosening of the arthroplasty because of osteoclas-  
155 tic bone resorption; this phenomenon, otherwise referred to as osteolysis, is initiated and  
156 maintained by the constant endocytosis of wear debris (Ingham & Fisher 2005). Prostheses  
157 with all-metal parts have been found to cause severe local tissue reactions as a result of metal  
158 hypersensitivity, manifesting in the form of aseptic lymphocytic vasculitis-associated lesions,  
159 metallosis and necrotic-appearing soft tissue masses (Keegan et al., 2007). To better under-  
160 stand the pathogenicity of metal and ceramic particles, *in vitro* studies have exposed phago-  
161 cytic cells to debris generated in joint simulators (Revell et al., 1997; Williams et al., 2003).  
162 Although different cell types respond differentially to wear debris, it seems that its patho-  
163 genicity is overall dose-dependent (Allen et al., 1997; Rodgers et al., 1997) and the elicited  
164 inflammatory responses also depend on the particles' size and morphology (Yang et al.,  
165 2002). When it comes to size, the equivalent circle diameter of debris can range from a few  
166 tens of nanometers to more than 10 micrometers and it has been suggested that the sub-  
167 micrometric fraction is more readily phagocytized by macrophages (Ingham & Fisher 2005).  
168 In the nanoscale, the total surface of a given amount of debris dramatically increases and  
169 metal and ceramic particles can be more readily dissolved in the acidic environment of phag-  
170 olysosomes. Thusly generated cations and complexes are suspected to hamper the cell's ho-  
171 meostasis and be potentially cytotoxic and genotoxic (Keegan et al., 2007; Tsaousi et al.,  
172 2010). Another red flag is the ability of nano-sized debris to leave its site of introduction to

173 the organism, travel through the lymphatic or circulatory system and accumulate to close-by  
174 or distant lymph nodes, the liver and spleen (Bos & Johannisson 2004; Elder et al., 2009).  
175 Therefore, while micrometer sized debris is spatially trapped close to the artificial joint, small  
176 enough particles might present a system-wide impact. Sub-micron polyethylene and metal  
177 particles have been observed in the liver and spleen of patients who had previously under-  
178 gone arthroplasties and a particular case of hepatosplenomegaly was associated with the  
179 presence of Ti-Al-Va alloy where it had brought upon the formation of granulomatous tissue  
180 (Urban et al., 2000; Urban et al., 2004). Figure 1 presents the possible local and systemic ef-  
181 fects exerted by metal debris generated from the fretting of all-metal prostheses.

182 In view of the oft-reported *in vitro* and *in vivo* toxicity of various nanomaterials and in  
183 conjunction with findings from relevant orthopedic studies, it is reasonable to be increasingly  
184 wary about the adverse effects of nano-sized wear debris. As it stands, debris' size, chemical  
185 composition and total mass are the major determining factors of the onset and intensity of an  
186 inflammatory response. Therefore, techniques applied on retrieved tissues should enable the  
187 sensitive and accurate analysis of said parameters at the nanoscale. Various approaches for  
188 isolating wear debris from periprosthetic tissues have been developed since the early '80s but  
189 it was only in the last 15 years that researchers started examining the nano-sized subpopula-  
190 tion of wear particles. In fact, these *ex vivo* studies are the first ever to have detected artificial  
191 nanoparticles in human samples and to have assessed their clinical importance.

### 192 **Extraction and analysis of nano-sized wear debris from periprosthetic samples**

193 By and large, the qualitative analysis of wear particles in periprosthetic tissues bene-  
194 fits from the fact that the pollutants in question are of known chemical composition. This is a  
195 great asset in the hands of researchers as they can tailor their laboratory routines to fit either  
196 UHMWPE, metal or ceramic particles. Suggested procedures in the literature have a strong  
197 underpinning in established biochemical protocols, such as the fractionation of cellular com-

198 ponents and the purification of proteins. During the past two decades, efforts have been made  
199 to adjust these practices to allow for the isolation of nanoparticles from biological media. To  
200 this end, three main steps are primarily followed: the digestion of the tissue, the centrifuga-  
201 tion of the liquefied digest and the filtration of the part containing the wear debris.

202 In order to compromise the samples' cellular integrity and destroy their tissular struc-  
203 ture (thus liberating entrapped wear debris), there are three available methods, namely the  
204 alkaline, acidic and enzymatic digestions. Each one of them has distinct advantages and dis-  
205 advantages that have been discussed thoroughly elsewhere (Niedzwiecki et al., 2001; Baxter  
206 et al., 2009). In brief, the alkaline and acidic digestions are both very efficient at mineralizing  
207 organic matter, although they require rigorous precautionary measures. The enzymatic meth-  
208 od is safer but more expensive and time-consuming and might not hydrolyze completely all  
209 types of tissue. The benefit of knowing what kind of particles are to be encountered accord-  
210 ing to the materials of the prosthesis allows for the most suitable reagents to be deployed. Ta-  
211 ble 1 summarizes the reagents and techniques deployed as well as the results from the most  
212 prominent clinical studies of the nanoparticulate load of periprosthetic samples.

213 Another two widely used techniques for the extraction of particles from periprosthetic  
214 samples are the centrifugation and the filtration of the homogenized digest. Centrifugation is  
215 employed in order to separate artificial particles from organic species based on their distinctly  
216 different densities when compared to the bulk liquid medium. Upon centrifugation, polyeth-  
217 ylene particles emerge to the surface of the digest, owing to buoyancy, whereas metal and  
218 ceramic particles, being denser than the digest, move towards the bottom end of the tube  
219 (Šlouf et al., 2004; Milošev & Remškar 2009).

220 Membrane filtration is often the final step of existing methodologies and facilitates  
221 electron microscopy, x-ray spectroscopy and the weight measurement of extracted particles  
222 by depositing them on the filter surface after discarding the liquid medium into which they



223 were dispersed. With the use of field-emission gun scanning electron microscopy (FEG-  
224 SEM) becoming more widespread, it became apparent that debris contained a subpopulation  
225 of particles which was small enough to pass through the filter pores when the latter measured  
226 larger than 100 nm in diameter (Scott et al., 2001; Šlouf et al., 2004). Smaller filter pores  
227 were, therefore, employed, but that introduced the need for multiple filtration steps in order to  
228 remove micron sized debris or undigested organic material that could clog the nano-sized  
229 pores (Richards et al., 2008).

230 Some researchers have conducted studies by circumventing the digestion-  
231 centrifugation-filtration procedure and solely observing the retrieved samples by means of a  
232 transmission electron microscope (TEM). The periprosthetic tissues are prepared according to  
233 standard TEM protocols which include fixation, dehydration, embedment in suitable resins  
234 and ultra-thin sectioning of the sample (Doorn et al., 1998; Benz et al., 2001; Hatton et al.,  
235 2002). In a recent study, Topolovec et al. noticed in a tissue section a population of nanopar-  
236 ticles with dimensions smaller than those detected after the same samples were treated with  
237 the digestion-centrifugation-filtration procedure, underlining the need of further optimization  
238 of this kind of protocols (Topolovec et al. 2014). Figure 2 presents electron micrographs from  
239 applying both procedures on periprosthetic samples.

### 240 **Standard practices**

241 After decades of research on the degradation of implant materials, there are now two  
242 standardized practices available for the *ex vivo* treatment of biological samples, the extraction  
243 of contained debris and its characterization: the ASTM Standard F561-13 (ASTM 2013) and  
244 an international standard issued by the International Standards Organisation (ISO) (ISO  
245 2011). They both describe numerous available procedures on the digestion of organic materi-  
246 al (alkaline, acidic and enzymatic) and provide adjustments to various samples, like tissues,  
247 synovial fluid or artificial wear test liquids. When it comes to the physical extraction of wear

248 particles from a biological environment, both organizations introduce centrifugation of di-  
249 gests on variable density gradients and multiple wash cycles. On the whole, ASTM F561-13  
250 provides more studious descriptions and proposes more elaborate chemical and physical  
251 treatment while ISO is being more succinct. Interestingly, despite the use of sophisticated lab  
252 equipment (ultracentrifuge), relatively expensive reagents (enzymes) and long procedures  
253 that require up to 4 working days per sample, neither of them claims to provide a quantitative  
254 retrieval of wear debris. On the other hand, both of them have been updated so as to provide  
255 guidelines for the morphological characterization of any extracted population of nanoparti-  
256 cles. In the 2013 revision of the ASTM F561 standard practice, two acclaimed studies by Bil-  
257 li et al. that cater for the minimization of particle loss and their accurate qualitative character-  
258 ization have been incorporated (Billi et al., 2012a; Billi et al., 2012b). More specifically, the-  
259 se two studies suggest a one-step enzymatic digestion in tandem with density gradient cen-  
260 trifugation of tissue or liquid samples that deposits the extracted particles (polyethylene, met-  
261 al or ceramic) onto a TEM grid or a Si wafer. They can thus avoid any possible loss of parti-  
262 cles that might incur during multi-step procedures, provide a snapshot of the dispersion state  
263 of particulate debris and allow for the observation of a number of instances large enough for  
264 the safe statistical analysis of the debris' morphological parameters.

265

## 266 **Nanoparticles in samples of patients suffering from idiopathic diseases**

267 The second section of this review is dedicated to studies of biopsies retrieved from the  
268 liver, kidney, colon and lungs of patients. The pathological importance of nano-sized objects  
269 detected in these samples is the main question of those investigations. It is interesting to re-  
270 view the techniques for the detection of nanoparticles of unknown nature and quantity as well  
271 as any conclusions made with regards to the patients' symptomatology. A summary of these  
272 studies is presented in Table 2.

273 **Clinical relevance of detected nanoparticles**

1  
2  
3 274 The association of random or incidental nanoparticulate findings with pathological  
4  
5 275 conditions is not as easy to track as it is for nano-sized wear debris originating from prosthe-  
6  
7 276 ses for which *in vitro* and *in vivo* studies delineate their pathogenicity against cells and tissues  
8  
9  
10 277 (Keegan et al., 2007; Thrivikraman et al., 2014). The exploratory studies that will be present-  
11  
12 278 ed hereafter had the objective to unravel possible causative links between idiopathic patho-  
13  
14  
15 279 logical conditions and various nanoparticles present in the affected part of the organism. Fig-  
16  
17 280 ure 3 presents two of the most striking cases that have been documented so far.

18  
19  
20 281 The first ever study of this sort examined biopsies from 12 patients who suffered  
21  
22 282 from hepatic and / or renal failure (Gatti & Rivasi 2002); interestingly, the initial samples’  
23  
24 283 histological examination described the cases as “granulomatosis of unknown origin”. Among  
25  
26  
27 284 them, one patient suffered from inflammatory chronic infiltrate and another presented with  
28  
29 285 granuloma formations. Eventually, particles of inorganic nature, specifically BaSO<sub>4</sub> and Au  
30  
31  
32 286 nanoparticles, were detected in their biopsies. They were considered to be remnants of a pre-  
33  
34 287 vious examination and a colloidal-gold therapy therapeutic injection, respectively. The detec-  
35  
36  
37 288 tion of nanoparticles at the diseased sites underscored the possibility that some idiopathic pa-  
38  
39 289 thologies might be caused, aggravated by or be otherwise related to the presence of these arti-  
40  
41  
42 290 ficial nano-objects. Upon this notion, the team coined the term “nano-pathology”. Two years  
43  
44 291 later, the presence of inorganic nanoparticles in colon biopsies afflicted with Crohn’s disease,  
45  
46 292 cancer or ulcerative colitis - all conditions of unknown origin - was investigated by the same  
47  
48  
49 293 team (Gatti 2004). In a total of 16 samples, 3 retrieved from cancer patients showed nano-  
50  
51 294 sized particles of zirconium, silicon and titanium, among other elements. An interesting ob-  
52  
53  
54 295 servation was that the size of particles decreased in sites farther from the mucosa surface,  
55  
56 296 suggesting an easier translocation of nanoparticles across the inflamed mucosal barrier, a  
57  
58  
59 297 concept that is now backed by several other studies (Lai et al., 2009; Collnot et al., 2012).

298 The discovery of particulate debris at the site of serious diseases challenged anew the concept  
1  
2 299 of fully biocompatible materials and highlighted the need to define the relation between in-  
3  
4  
5 300 gested particles and idiopathic diseases. Gatti et al. conducted yet another two studies in  
6  
7 301 which they examined the particulate retentate on explanted vena cava filters, i.e. removable  
8  
9 302 biomedical devices implantable into the inferior vena cava which are intended to prevent  
10  
11 303 pulmonary embolisms by entrapping and breaking up thrombi (Gatti et al., 2004; Gatti &  
12  
13 304 Montanari 2006). In the two studies combined, there were 20 samples retrieved from an equal  
14  
15 305 number of patients. Thirteen of them suffered from deep vein thrombosis concurrent with  
16  
17 306 some other pathological condition; the remaining 7 had received the implant as part of a  
18  
19 307 prophylactic treatment. On the isolated filters, clusters of nano-sized inorganic particles of  
20  
21 308 exogenous origin (Pb, Ti, Cu) were observed, but information on their source of origin could  
22  
23 309 not be extrapolated. Likewise, it was difficult to conclude if it were the nanoparticles that fa-  
24  
25 310 vored the formation of thrombotic masses or if the thrombi themselves swept the NP in the  
26  
27 311 circulatory system. In any case, the studies underlined the importance of further exploring the  
28  
29 312 compatibility of NP with blood components.  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 313 In 2009, the first clinical report on the long-term toxicity of nanoparticles in humans  
37  
38 314 was performed by Song et al. (Song et al., 2009). The patients were 7 women who had been  
39  
40 315 suffering from shortness of breath and had amber-colored pleural and pericardial effusions  
41  
42 316 prior to their admission to the hospital, pointing to physical or chemical pulmonary irritation.  
43  
44 317 Although some biomarker values varied among them, they did share some major findings:  
45  
46 318 they all presented at least some lung damage, nonspecific interstitial inflammation, inflamma-  
47  
48 319 tory infiltration, pulmonary fibrosis and foreign body granulomas of the pleura; at the same  
49  
50 320 time none of them had tumor markers or virological findings relevant to their clinical condi-  
51  
52 321 tion. They had all been working for several months in the same poorly ventilated environ-  
53  
54 322 ment and had been exposed to an airborne dust of polyacrylic ester which contained known  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

323 carcinogens (ethylene dioxide) as well as other dangerous substances (toluene), among oth-  
324 ers. It was also found that the airborne dust contained silica nanoparticles of a diameter rang-  
325 ing from 2 to 30 nm. Said nanoparticles were spotted in the chest fluid, in mesothelial cells of  
326 the pleural fluid as well as in various cells and structures of the macrophages and in bioptic  
327 lung tissue (in blood and lymphatic vessels, endothelial cells). The fact that the clinical image  
328 of the patients continued to deteriorate months after their removal from their workplace, led  
329 the medical team to consider the detected nanoparticles as one of the causes behind their con-  
330 dition. Their claims were predicated on certain *in vitro* and *in vivo* studies which found  
331 amorphous silica nanoparticles to have a toxic effect on cells and tissues through oxidative  
332 stress, genotoxic and inflammatory phenomena. However, the conclusion that silica nanopar-  
333 ticles are culpable for the pathological findings can only be tentative given that the examined  
334 patients had been exposed to a host of toxic substances and that artificial nano-sized objects  
335 were effectively cleared through the lymphatic system over the course of their treatment.

336 To our knowledge, the most recent clinical study that detected artificial, nano-sized  
337 objects in the lungs of patients is the work carried by Wu et al. (Wu et al., 2010). They pre-  
338 sented the clinical, pathological and mineralogical findings from the examination of 7 pa-  
339 tients previously exposed to dust containing high levels of airborne pollutants. The patients  
340 presented several symptoms, including dyspnea, persistent cough and chest pain. Prompted  
341 by the patients' unexplained radiological findings, the clinicians decided to obtain lung biop-  
342 tic material. The histopathological images were complex as they revealed various types of  
343 fibrosis for 5 patients and bronchiolitis for 3 patients corroborating the patients' debilitating  
344 non-specific interstitial pneumonitis and restrictive lung disease. The mineralogical findings  
345 were equally diverse, with heavy loads of chrysotile asbestos, aluminum silicates and single-  
346 walled carbon nanotubes (SWCNT) in 3 out of 7 patients. The SWCNT appeared either alone  
347 or in pairs and were found to be of various lengths. Based on several *in vivo* studies, the au-

1 348 thors highlighted that certain types of carbon nanotubes are pro-inflammatory, capable of in-  
2 349 ducing granulomas and causing lung injury that could lead to asbestos-like pathogenicity.  
3  
4  
5 350 However, they refrained from speculating on the exact causation of the symptoms, given that  
6  
7 351 the examined patients were also exposed to toxic gases and fibrous and particulate materials  
8  
9 352 of known toxic potential were also deposited in their lungs at levels higher than normal.

### 13 353 ***Ex vivo* exploration of the nanoparticulate load of clinical samples**

14  
15  
16 354 The guiding principle of the studies found in this section is that the presence of nano-  
17  
18 355 particles in the investigated samples was either an accidental finding or an assumed possibil-  
19  
20  
21 356 ity. Naturally, the first step has been to confirm their presence: retrieved samples were ob-  
22  
23 357 served by means of transmission or scanning electron microscopy and the detected objects  
24  
25 358 were qualitatively analyzed by the acquisition of energy-dispersive X-ray spectra (EDS).

26  
27  
28 359 Out of the 7 relevant papers, TEM images of the detected NP were available in 3 of  
29  
30 360 them (Song et al., 2009; Wu et al., 2010; Song et al., 2011). Song et al. observed 20 to 80 nm  
31  
32  
33 361 sections of lung biopsies and chest fluids without submitting them to any prior treatment.  
34  
35 362 This method allowed for the detection of nano-sized particles, their morphological descrip-  
36  
37  
38 363 tion, detailed localization and resolution of spatial interaction with subcellular organelles  
39  
40 364 (Song et al., 2011). Moreover, follow-up observations in chest fluid over the course of sever-  
41  
42  
43 365 al months hinted at the nanoparticles being eliminated from the patients' lower respiratory  
44  
45 366 tract. At this point though, inherent limitations in TEM imaging, to which we alluded in the  
46  
47  
48 367 corresponding section of wear nanoparticles, hampered the study: in brief, the size of ob-  
49  
50 368 served nanoparticles had to be limited by the thickness of the section (< 80 nm) and the cal-  
51  
52 369 culated size distribution was ostensibly derived by a small and statistically insignificant frac-  
53  
54  
55 370 tion of the tissue or fluid in question.

56  
57 371 Alternatively, Gatti et al. opted for environmental scanning electron microscope  
58  
59 372 (ESEM) imaging of colonic, renal and hepatic bioptic samples. ESEM is an electron micro-

1 373 scope which performs well even in low vacuum conditions and does not require prior metal-  
2 374 lization of the sample, thus reducing the number of preparation steps and the risk of introduc-  
3  
4 375 ing artefacts (Gatti & Rivasi 2002; Gatti et al., 2004; Gatti & Montanari 2006). Complemen-  
5  
6  
7 376 tary backscatter electron (BSE) imaging was used to reveal the existence of nanoparticles  
8  
9  
10 377 covered by thin layers of cancer tissue. Having said that, ESEM's ability to resolve the size  
11  
12 378 and morphology of particles suffers in the nanometer scale, therefore it was only possible to  
13  
14 379 trace clusters rather than individual nanoparticles and BSE images of tissue covered nanopar-  
15  
16  
17 380 ticles fail to clearly define their borders, rendering size measurements difficult for unknown  
18  
19 381 nanoparticles (Gatti 2004) .

22 382           Regarding the quantitation of detected nanoparticles, Wu et al. opted for an alkaline  
23  
24 383 digestion of the bioptic tissue prior to TEM imaging and were thus able to estimate the con-  
25  
26 384 centration of SWCNT in grams per wet weight of tissue, albeit losing information on their  
27  
28  
29 385 exact site of residence (interstitial space, macrophages, epithelial cells, etc.). The only other  
30  
31 386 quantitative approach was demonstrated by Song et al. Based on their assertion that silica na-  
32  
33  
34 387 noparticles in the lung tissue and pleural fluids should be held responsible for the grave con-  
35  
36 388 dition of their patients, they performed an ICP-MS analysis on the sampled pleural effusion  
37  
38  
39 389 of patients. The patient's load of elemental Si was almost twice that of non-exposed individu-  
40  
41 390 als, but it was not made clear what fraction of the measured quantity was specifically due to  
42  
43 391 silicon-containing particulates and what fraction corresponded to the Si homeostasis of the  
44  
45  
46 392 patient.

48 393

51 394

53 395

56 396

58 397



398 **Discussion of methodological caveats and relevant suggestions**

399 **Quantitative extraction of nano-sized wear debris**

400 The weakest point in both the reviewed clinical studies and standard procedures on  
401 the extraction of nanoparticles from periprosthetic samples is that they do not provide a quan-  
402 titative analysis and thus compromise the calculation of total mass or absolute number of na-  
403 noparticulate debris tissues have come in contact with. Another implication pertains to the  
404 measured size distribution of nanoparticles and how inaccurate it might be with an unknown  
405 portion of the particles not being successfully retrieved. Nanoparticles' mass and size distri-  
406 butions and, in extension, their total surface, are quantitative parameters that govern their tox-  
407 ic potential against living systems (Nel et al., 2006). These properties unbeknownst, it is  
408 troublesome to compare findings from different studies or establish unassailable links be-  
409 tween particles found in patients' samples and their respective symptomatology.

410 More specifically, it is important to note that the digestion procedures that are con-  
411 sistently followed when examining periprosthetic samples were initially developed with mi-  
412 crometer- or millimeter-sized particles in mind, before the presence of nano-sized debris was  
413 even verified (Campbell et al., 1994). In fact, the size of nanoparticles challenges the aptness  
414 of existing digestion methods. To begin with, when passing from the bulk to the nanoparticu-  
415 late state, there are changes imparted to the chemical reactivity of a particle owing to modifi-  
416 cations of their prevailing structural and electronic properties. For example, even for metal  
417 oxides which are chemically inert in their bulk form, the available surface for solid-liquid in-  
418 teractions at a given mass vastly increases at the nanoscale (Fernández-García & Rodriguez  
419 2007), thus accelerating the kinetics of dissolution. In addition, there is a possible increase in  
420 the ionic nature of the metal-oxygen bond as well as an adaptation of the band gaps (McHale  
421 et al., 1997). Therefore, digestion methods fit for large particles might partially or entirely  
422 dissolve their nano-sized counterparts, undermining the veracity of the measured mass and

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

423 size distribution. Lastly, the liquefied samples are often filtered in order to remove any undi-  
424 gested tissue or discard the liquid medium and allow for the observation of particles by  
425 means of electron microscopy. Unfortunately, there is now compelling evidence that nano-  
426 particles can get trapped in the fibrous matrix of some filters, introducing yet another bias  
427 against size distribution measurements (Lapcikova et al., 2009)

Following the mineralization of tissues and the dissolution of contained particles un-  
der strong acidic conditions, the total mass of most elements in a sample can be successfully  
measured by means of inductively coupled plasma optical emission spectroscopy or mass  
spectroscopy (ICP-OES or ICP-MS, respectively) (Iyengar & Woittiez 1988, Vanhoe 1993).  
Despite their very low detection limits and high accuracy, these destructive techniques do not  
convey information on how this mass is distributed within a polydisperse population of parti-  
cles. An emerging technique called single-particle ICP-MS (spICP-MS) is a variation on ICP-  
MS able to measure both the size and the diameter of metal-containing nanoparticles by ana-  
lyzing them one at a time (Pace et al., 2011). In the work of Gray et al., ground beef was  
spiked with gold and silver nanoparticles and, after the digestion of samples with tetrame-  
thylammonium hydroxide, it was possible to recover them quantitatively (at  $89\pm 3\%$  and  
 $104\pm 2\%$  for gold and silver nanoparticles, respectively) and, at the same time, extrapolate  
their size according to the intensity of spikes on the recorded spectra (Gray, Coleman et al.,  
2013). Albeit very promising, it has to be noted that spICP-MS is more suited for particles of  
known, homogeneous composition and geometry and, for the time being, further optimiza-  
tions are necessary before this technique can be seamlessly applied to biological samples  
which might contain nanoparticles of unknown morphology and composition.

Conversely, for cases where the morphological and chemical examination of the na-  
noparticles are not of the question, Fraikin et al. have developed a custom-made, micro-  
fluidic, electronic device that appears very adept at resolving the size and absolute concentra-

448 tion of sub-micron and nano-sized particles (Fraikin et al., 2011). Their device possesses two  
1  
2 449 significant advantages over more conventional techniques which are based on the Brownian  
3  
4  
5 450 motion of nanoparticles, like dynamic light scattering (DLS) or nanoparticle tracking analysis  
6  
7 451 (NTA). Firstly, their detector has a stronger ability to resolve the size distribution of polydis-  
8  
9  
10 452 perse particle populations; secondly, is that the refractive index of the observed particles is  
11  
12 453 not a prerequisite for the calculation of the particles' absolute concentrations. On the other  
13  
14 454 hand, an innate shortcoming of the detector is that it considers all particles to be spherical, as  
15  
16  
17 455 do DLS and NTA, too. Interestingly enough, though, the shape of UHMWPE particles actual-  
18  
19 456 ly tends to be spherical when their size drops below the 100 nm mark, as mentioned by Nine  
20  
21  
22 457 et al. in their comprehensive review, so this technique seems poised for granulometric anal-  
23  
24 458 yses of the synovial fluid around joint prostheses (Nine, Choudhury et al., 2014).

#### 459 **Qualitative characterization of nano-sized wear debris**

460 A non-quantitative extraction of wear debris from within periprosthetic samples com-  
31  
32  
33 461 promises the observed qualitative data because its sampling is by default non-representative.  
34  
35 462 The affected qualitative parameters are the morphology of particles (shape, geometry, tex-  
36  
37  
38 463 ture) and chemical identity (composition, surface moieties) and they can be distorted because  
39  
40 464 of the powerful alkaline or acidic conditions employed for the sample's digestion. More spe-  
41  
42  
43 465 cifically, skewed interpretations of the aggregation state of nanoparticles are due to the ten-  
44  
45 466 dency of nanoparticles to agglomerate or even aggregate upon steep changes in their zeta-  
46  
47  
48 467 potential, themselves generated by extreme  $\text{H}_3\text{O}^+$  or  $\text{OH}^-$  concentration values (Catelas et al.,  
49  
50 468 2001; Scott et al., 2001). Furthermore, the ubiquitous process of centrifugation, although in-  
51  
52 469 nocuous for micron-sized particles, has been noted to promote agglomeration of smaller par-  
53  
54  
55 470 ticles and to cause nanoparticle to strongly adhere to the walls of tubings because of van der  
56  
57 471 Waals forces (Hasselov et al., 2008). Eventually, these two phenomena might return mis-  
58  
59  
60 472 leading data concerning the dispersion state of the particles, their size distribution and cumu-

473 lative mass, all of which are parameters linked to their pathogenic potential. Finally, concern-  
474 ing their chemical identity, metallic debris is prone to passivation and certain alloys can be  
475 partially dissolved, therefore gravely altering their surface chemistry and composition, re-  
476 spectively (Dulski 1996)

477 Figure 4 recapitulates in the form of examples the most common methodological ca-  
478 veats that thwart the reliability of the quantitative and qualitative analysis of nano-size wear  
479 debris.

### 480 **The potential role of the nanoparticles' biological coating**

481 Another possible culprit for procedures that utilize hydrolyzing agents is the hydroly-  
482 sis of the nanoparticles' protein and lipid coating. This organic layer, generally referred to as  
483 "protein corona", has been shown to gravely determine the hydrodynamic size and dispersi-  
484 bility of some nanoparticles (Izak-Nau et al., 2013), but it is most probably altered during  
485 chemical or enzymatic hydrolysis, although this has not yet been confirmed. Beyond its im-  
486 pact in their colloidal properties, protein coronas act as the nanoparticles' "biomolecular fin-  
487 gerprints" as well, able to influence their pathophysiological effect (Tenzer et al., 2013). The  
488 exact involvement of a protein corona in the development of pathologies is not yet fully elu-  
489 cidated, however the corona's composition and structural conformation seems to play a role  
490 in the particles pathogenic ability (Hajipour et al., 2014). The composition of this layer is dy-  
491 namic and depends on various conditions, including the existing biochemical environment  
492 and the nanoparticle's own surface chemistry and geometry. It is known that a lot of these  
493 molecules are antibodies and complement proteins that normally facilitate the uptake of path-  
494 ogens by phagocytes in a process much similar to that of opsonization for bacteria (Morten-  
495 sen et al., 2013).

496 Identification of the nanoparticles' protein corona might seem unnecessary in the field  
497 of biomedical implants, it could, however, contribute to the engineering of better-tolerated

1 498 materials, even after significant fretting. In the available literature, aggressive enzymatic or  
2 499 chemical treatment is the only way for extracting nanoparticles from tissular samples, but  
3  
4 500 they might not be necessary for synovial fluid. This liquid lubricates the joints and it has been  
5  
6  
7 501 shown that particles like crystals or other solid bodies can be extracted from it after applying  
8  
9 502 less of a destructive treatment (Pascual & Jovaní 2005). It could be thus possible to monitor  
10  
11 503 the biological species that adsorb on their surface and explore their association with the parti-  
12  
13  
14 504 cles pathogenicity.

16  
17 505           Research on the protein corona during the past decade conflated proteomics and nano-  
18  
19 506 toxicology with most of the published articles exploring the effects of well-defined biological  
20  
21 507 media (protein dispersions, sera, etc.) on well-characterized nanoparticles (Lacerda et al.,  
22  
23 508 2010; Xu et al., 2012). However, there have been some more far-reaching studies: Kapralov  
24  
25 509 et al. isolated and purified single-walled carbon nanotubes from mouse alveolar lavage  
26  
27 510 through a single-step gradient (Kapralov et al., 2012). Although the quantitative efficiency of  
28  
29 511 the extraction was not of the question, it allowed for the proteomic analysis of the CNT's co-  
30  
31 512 rona and their simultaneous morphological characterization. Single-step gradient centrifuga-  
32  
33 513 tions are simple and utilize the difference in density between biological species and most na-  
34  
35 514 noparticles. It is thus possible that they can be applied on a wide range of materials. Follow-  
36  
37 515 ing suite, both qualitative (morphology, chemical composition, etc.) and quantitative (total  
38  
39 516 mass, size distribution) assessments should be possible using the right equipment.

### 47 517           **The challenging investigation of clinical samples for unknown nano-sized objects**

48  
49 518           The initial objective of the currently reviewed exploratory studies was to verify the  
50  
51 519 presence of nanoparticles in the examined clinical samples. When this was the case, most re-  
52  
53 520 searchers also determined the NP's chemical composition and one team also quantified them.  
54  
55 521 Owing to the scope of these works, the analytical tool of choice was electron microscopy in  
56  
57 522 tandem with EDS which revealed some essential information on the physicochemical nature  
58  
59  
60

1 523 of nanoparticles: size, shape and chemical composition. On the down-side, the size of the  
2 524 largest observable particle was limited by the thickness of the observed section and the area  
3  
4 525 of the sample under investigation was limited, too. EDS is routinely used for elemental anal-  
5  
6  
7 526 yses in material sciences but carries the risk of returning very weak signals when performed  
8  
9  
10 527 on single or small clusters of nanoparticles.

11  
12 528 To overcome some of the above caveats and accomplish statistical significance (at  
13  
14 529 least in terms of size distribution), researchers randomly observe multiple sites of the grid and  
15  
16  
17 530 count at least a few hundreds of particles. It was during the last few years, though, that some  
18  
19 531 rethinking of electron microscopy practices has returned an increased amount of significant  
20  
21  
22 532 data. A notable example is the work of Elsaesser et al. (Elsaesser et al., 2011) where they  
23  
24 533 proposed the homogeneous embedment of a known number of cells in a predetermined vol-  
25  
26 534 ume of a cylindrical resin tube. Across the entire length of the tube, random sections were  
27  
28  
29 535 imaged and through electronic image processing, the number and size of administered Au  
30  
31  
32 536 nanoparticles could be calculated, while also resolving their subcellular localization. Because  
33  
34 537 the number of cells, thickness of sections and length of the cell-containing tube were all  
35  
36 538 known, the statistical significance of the obtained data was ascertained. The entire process is  
37  
38  
39 539 ostensibly longer and quite delicate, but it succeeds at providing statistically robust quantita-  
40  
41 540 tive information on the spatial arrangement of nanoparticles in addition to their morphologic  
42  
43  
44 541 description.

45  
46 542 In the context of exploratory studies, any objects of interest will always have to be de-  
47  
48  
49 543 tected before attempting any other type of more in-depth analysis. In other words, electron  
50  
51 544 microscopy will be a prerequisite to ensemble techniques, like DLS or ICP-MS, which re-  
52  
53 545 quire their own sample treatment. That is the reason why stereological, statistically exploita-  
54  
55  
56 546 ble imaging of samples like the one described above is of great importance: they present a big  
57  
58 547 opportunity to acquire qualitative and quantitative data as well as insight to the nanoparticles’

1 548 cellular uptake, clearance and pathological effect. Such possibilities bode well for investigat-  
2 549 ing cell suspensions of liquid clinical samples, such as pleural effusions, alveolar lavages and  
3  
4 550 whole blood. A thorough review of the latest advances in microscopy and analytical tech-  
5  
6  
7 551 niques as well as a presentation of their advantages and drawbacks for the quantification of  
8  
9 552 nanoparticles in biological environments has been compiled by Elsaesser et al. and is a  
10  
11  
12 553 strongly recommended read (Elsaesser et al., 2010).

13  
14 554

## 17 555 **Conclusions**

18  
19  
20 556         Engineered nanomaterials are increasingly integrated into products and services of the  
21  
22  
23 557 medical, construction and high-tech fields, forming a rapidly growing market. It is thus safe  
24  
25 558 to assume that human exposure to the nanoparticles that make up those nanomaterials is most  
26  
27  
28 559 likely to increase through direct interactions with nano-engineered products, with the by-  
29  
30 560 products generated during their life-cycles and through occupational exposure. In knowledge  
31  
32 561 of the asbestos hazards and amidst the precariousness that surrounds some commercialized  
33  
34  
35 562 nanoparticles, it is no wonder there is an unceasing scientific interest in their biopersistence  
36  
37  
38 563 and biocompatibility. A substantial body of peer-reviewed research has already been con-  
39  
40 564 ducted and results suggest that some of the most salient nanoparticles could have long-term  
41  
42 565 harmful effects on living cells and tissues.

43  
44  
45 566         At the same time, the analysis of nanoparticles that might have been deposited and  
46  
47 567 accumulated in patients along with the evaluation of their pathophysiological, remains an un-  
48  
49  
50 568 explored field. As evidenced in this review, the quantitative and qualitative analysis of nano-  
51  
52 569 particles in human biological samples is an undoubtedly daunting scientific endeavor. With-  
53  
54  
55 570 out protocols or instruments capable to cope with the complexity of biological environments,  
56  
57 571 the few available clinical studies rely on the adaptation of practices originally developed for  
58  
59 572 material sciences and biochemistry, sometimes dating several decades old. Their major short-



573 coming is the complete lack of any quantitative assessment of the nanoparticles load in a giv-  
1  
2 574 en clinical sample. In consequence, qualitative data on the chemical composition, size and  
3  
4  
5 575 morphology of detected nanoparticles also becomes potentially. Furthermore, it is unsafe to  
6  
7 576 judge the true pathological significance of the nanoparticulate load found in the examined  
8  
9  
10 577 clinical samples as they are almost always concurrent with larger particles or the patients  
11  
12 578 have been simultaneously exposed to other toxic or potentially harmful substances.

13  
14 579 To solve this conundrum and come one step closer to the exhaustive physicochemical  
15  
16  
17 580 analysis of nanoparticles in human biological samples which is also medically relevant, re-  
18  
19 581 search at the nano-bio interface will have to intensify. At the nanometrology front, there is  
20  
21  
22 582 already a lot of activity towards the accurate and precise characterization of various types of  
23  
24 583 nano-objects (Brown et al., 2013). On the other hand, the scarcity of relevant clinical studies  
25  
26  
27 584 demonstrates the need to improve upon existing methodologies of detection and isolation of  
28  
29 585 nanoparticles from within biological samples. We suggest that this purpose could be well-  
30  
31  
32 586 served by clinical samples stored in hospitals and which effectively function as atypical spec-  
33  
34 587 imen banks. Such samples include biological fluids (blood, urine, broncho-alveolar lavages,  
35  
36 588 follicular fluid, sperm, etc.) or tissues (bioptic material) that are stored mainly for administra-  
37  
38  
39 589 tive purposes and which with proper respect to personal privacy, their employment can help  
40  
41 590 devise harmonized and inter-comparable methods of detection, extraction and characteriza-  
42  
43  
44 591 tion of nanoparticles. On this common denominator, large-scale studies could be launched in  
45  
46 592 order to lay the foundations for future, meaningful and timely correlations between nano-  
47  
48  
49 593 objects detected in those samples and the pathological conditions of their respective patients.

50  
51 594

52  
53 595

54  
55  
56 596

57  
58 597

1 598 **Declaration of interest statement**

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

599 The authors of this work declare that they have no conflicts of interest of any kind.

600

1 **Bibliography**

2  
3  
4 602 Allen MJ, Myer BJ, Millett PJ, Rushton N. 1997. The effects of particulate cobalt, chromium  
5  
6 603 and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro. *J Bone Joint Surg Br*  
7  
8 604 79:475-482.

10  
11 605 ASTM International. 2013. ASTM Standard F561-13; Standard Practice for Retrieval and  
12  
13 606 Analysis of Medical Devices, and Associated Tissues and Fluids. Available:  
14  
15  
16 607 <http://www.astm.org/Standards/F561.htm> [accessed 22 August 2014].

17  
18 608 Baxter RM, Steinbeck MJ, Tipper JL, Parvizi J, Marcolongo M, Kurtz SM. 2009. Compari-  
19  
20  
21 609 son of periprosthetic tissue digestion methods for ultra-high molecular weight polyethylene  
22  
23 610 wear debris extraction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91:409-418.

24  
25 611 Benz EB, Federman M, Godleski JJ, Bierbaum BE, Thornhill TS, Spector M. 2001. Trans-  
26  
27  
28 612 mission electron microscopy of intracellular particles of polyethylene from joint replacement  
29  
30  
31 613 prostheses: size distribution and cellular response. *Biomaterials* 22:2835-2842.

32  
33 614 Berman DW, Crump KS. 2008. A meta-analysis of asbestos-related cancer risk that addresses  
34  
35 615 fiber size and mineral type. *Crit Rev Toxicol* 38:49-73.

36  
37  
38 616 Billi F, Benya P, Kavanaugh A, Adams J, Ebramzadeh E, McKellop H. 2012. The John  
39  
40  
41 617 Charnley Award: an accurate and sensitive method to separate, display, and characterize wear  
42  
43 618 debris: part 1: polyethylene particles. *Clin Orthop Relat Res* 470:329-338.

44  
45 619 Billi F, Benya P, Kavanaugh A, Adams J, McKellop H, Ebramzadeh E. 2012. The John  
46  
47  
48 620 Charnley Award: an accurate and extremely sensitive method to separate, display, and char-  
49  
50 621 acterize wear debris: part 2: metal and ceramic particles. *Clin Orthop Relat Res* 470:339-350.

51  
52 622 Bos I, Johannisson R. 2004. Foreign body reactions in lymph nodes of oncology patients with  
53  
54  
55 623 joint prostheses--light-, electron microscopic and immunohistological investigations. *Pathol*  
56  
57 624 *Res Pract* 200:189-196.

1 625 Bozic KJ, Ong K, Lau E, Kurtz SM, Vail TP, Rubash HE, et al. 2010. Risk of complication  
2 626 and revision total hip arthroplasty among Medicare patients with different bearing surfaces.  
3  
4 627 Clin Orthop Relat Res 468:2357-2362.  
5  
6 628 Brown SC, Boyko V, Meyers G, Voetz M, Wohlleben W. 2013. Toward advancing nano-  
7  
8 629 object count metrology: a best practice framework. Environ Health Perspect 121:1282-1291.  
9  
10 630 Campbell P, Ma S, Schmalzried T, Amstutz HC. 1994. Tissue digestion for wear debris parti-  
11  
12 631 cle isolation. J Biomed Mater Res 28:523-526.  
13  
14 632 Catelas I, Bobyn JD, Medley JB, Krygier JJ, Zukor DJ, Petit A, et al. 2001. Effects of diges-  
15  
16 633 tion protocols on the isolation and characterization of metal-metal wear particles. I. Analysis  
17  
18 634 of particle size and shape. J Biomed Mater Res 55:320-329.  
19  
20 635 Chatterjee R. 2009. Calculating the costs of nanohazard testing. Environ Sci Technol  
21  
22 636 43:3405.  
23  
24 637 Collnot EM, Ali H, Lehr CM. 2012. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of  
25  
26 638 the inflamed intestinal mucosa. J Control Release 161:235-246.  
27  
28 639 Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA. 2010. Asbestos, carbon nanotubes and the  
29  
30 640 pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in  
31  
32 641 the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. Part Fibre Toxicol 7:5.  
33  
34 642 Donaldson K, Poland CA, Murphy FA, MacFarlane M, Chernova T, Schinwald A. 2013.  
35  
36 643 Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - similarities and differences. Adv Drug  
37  
38 644 Deliv Rev 65:2078-2086.  
39  
40 645 Doorn PF, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC. 1998. Metal  
41  
42 646 wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission elec-  
43  
44 647 tron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. J Biomed Mater Res  
45  
46 648 42:103-111.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

649 Dulski TR. (1996). A manual for the chemical analysis of metals. ASTM West Conshohock-  
1 en.  
2  
3  
4  
5 651 Elder A, Vidyasagar S, DeLouise L. 2009. Physicochemical factors that affect metal and  
6  
7 652 metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. Wiley Interdiscip Rev Nanomed  
8  
9  
10 653 Nanobiotechnol 1:434-450.  
11  
12 654 Elsaesser A, Barnes CA, McKerr G, Salvati A, Lynch I, Dawson KA, et al. 2011. Quantifica-  
13  
14 655 tion of nanoparticle uptake by cells using an unbiased sampling method and electron micros-  
15  
16 656 copy. Nanomedicine (Lond) 6:1189-1198.  
17  
18  
19 657 Elsaesser A, Taylor A, de Yanés GS, McKerr G, Kim E-M, O'Hare E, et al. 2010. Quantifica-  
20  
21 658 tion of nanoparticle uptake by cells using microscopical and analytical techniques. Nanomed-  
22  
23 659 icine (Lond) 5:1447-1457.  
24  
25  
26 660 Fernández-García M, Rodríguez JA. 2007. Metal oxide nanoparticles. Encyclopedia of Inor-  
27  
28 661 ganic and Bioinorganic Chemistry.  
29  
30  
31 662 Fraikin JL, Teesalu T, McKenney CM, Ruoslahti E, Cleland AN. 2011. A high-throughput  
32  
33 663 label-free nanoparticle analyser. Nat Nanotechnol 6:308-313.  
34  
35  
36 664 Gatti AM. 2004. Biocompatibility of micro- and nano-particles in the colon. Part II. Bio-  
37  
38 665 materials 25:385-392.  
39  
40  
41 666 Gatti AM, Montanari S. 2006. Retrieval analysis of clinical explanted vena cava filters. J Bi-  
42  
43 667 omed Mater Res B Appl Biomater 77:307-314.  
44  
45  
46 668 Gatti AM, Montanari S, Monari E, Gambarelli A, Capitani F, Parisini B. 2004. Detection of  
47  
48 669 micro- and nano-sized biocompatible particles in the blood. J Mater Sci Mater Med 15:469-  
49  
50 670 472.  
51  
52  
53 671 Gatti AM, Rivasi F. 2002. Biocompatibility of micro- and nanoparticles. Part I: in liver and  
54  
55 672 kidney. Biomaterials 23:2381-2387.  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 673 Gray EP, Coleman JG, Bednar AJ, Kennedy AJ, Ranville JF, Higgins CP. 2013. Extraction  
2 674 and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle in-  
3  
4 675 ductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 47:14315-14323.  
6  
7 676 Hajipour MJ, Laurent S, Aghaie A, Rezaee F, Mahmoudi M. 2014. Personalized protein co-  
8  
9 677 ronas: a “key” factor at the nanobiointerface. *Biomaterials Science*. 2:1210-1221  
11  
12 678 Hasselov M, Readman JW, Ranville JF, Tiede K. 2008. Nanoparticle analysis and character-  
13  
14 679 ization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotox-*  
15  
16 680 *icology* 17:344-361.  
18  
19 681 Hatton A, Nevelos JE, Nevelos AA, Banks RE, Fisher J, Ingham E. 2002. Alumina-alumina  
20  
21 682 artificial hip joints. Part I: a histological analysis and characterisation of wear debris by laser  
22  
23 683 capture microdissection of tissues retrieved at revision. *Biomaterials* 23:3429-3440.  
24  
25 684 Helland A, Scheringer M, Siegrist M, Kastenholz HG, Wiek A, Scholz RW. 2008. Risk as-  
26  
27 685 sessment of engineered nanomaterials: a survey of industrial approaches. *Environ Sci Tech-*  
28  
29 686 *nol* 42:640-646.  
30  
31  
32 687 Ingham E, Fisher J. 2005. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement.  
33  
34 688 *Biomaterials* 26:1271-1286.  
35  
36  
37 689 ISO (International Organization for Standardization). 2011. ISO 17583:2011(en) Wear of  
38  
39 690 implant materials – Polymer and Wear particles – Isolation and characterization. Gene-  
40  
41 691 va:ISO.  
42  
43  
44 692 Iyengar V, Woittiez J. 1988. Trace elements in human clinical specimens: evaluation of liter-  
45  
46 693 ature data to identify reference values. *Clin chem* 34:474-481.  
47  
48  
49 694 Izak-Nau E, Voetz M, Eiden S, Duschl A, Puntès VF. 2013. Altered characteristics of silica  
50  
51 695 nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization  
52  
53 696 prior to its toxicological evaluation. Part *Fibre Toxicol* 10:56.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

697 Kapralov AA, Feng WH, Amoscato AA, Yanamala N, Balasubramanian K, Winnica DE, et  
698 al. 2012. Adsorption of surfactant lipids by single-walled carbon nanotubes in mouse lung  
699 upon pharyngeal aspiration. ACS nano 6:4147-4156.

700 Keegan GM, Learmonth ID, Case CP. 2007. Orthopaedic metals and their potential toxicity  
701 in the arthroplasty patient A REVIEW OF CURRENT KNOWLEDGE AND FUTURE  
702 STRATEGIES. J Bone Joint Surg Br 89:567-573.

703 Lacerda SH, Park JJ, Meuse C, Pristinski D, Becker ML, Karim A, et al. 2010. Interaction of  
704 gold nanoparticles with common human blood proteins. ACS nano 4:365-379.

705 Lai SK, Wang YY, Hanes J. 2009. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene deliv-  
706 ery to mucosal tissues. Adv Drug Deliv Rev 61:158-171.

707 Lapcikova M, Slouf M, Dybal J, Zolotarevova E, Entlicher G, Pokorny D, et al. 2009. Na-  
708 nometer size wear debris generated from ultra high molecular weight polyethylene *in vivo*.  
709 Wear 266:349-355.

710 Linsinger T, Roebben G, Gilliland D, Calzolari L, Rossi F, Gibson P, et al. 2012. Require-  
711 ments on Measurements for the Implementation of the European Commission Definition of  
712 the Term 'nanomaterial'. Publications Office.

713 McHale JM, Auroux A, Perrotta AJ, Navrotsky A. 1997. Surface energies and thermodynam-  
714 ic phase stability in nanocrystalline aluminas. Science 277:788-791.

715 Milošev I, Remškar M. 2009. In vivo production of nanosized metal wear debris formed by  
716 tribochemical reaction as confirmed by high-resolution TEM and XPS analyses. J Biomed  
717 Mater Res A. 91:1100-1110.

718 Mortensen NP, Hurst GB, Wang W, Foster CM, Nallathamby PD, Retterer ST. 2013. Dy-  
719 namic development of the protein corona on silica nanoparticles: composition and role in tox-  
720 icity. Nanoscale 5:6372-6380.



- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 721 Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*  
722 311:622-627.
- 723 Niedzwiecki S, Klapperich C, Short J, Jani S, Ries M, Pruitt L. 2001. Comparison of three  
724 joint simulator wear debris isolation techniques: acid digestion, base digestion, and enzyme  
725 cleavage. *J Biomed Mater Res* 56:245-249.
- 726 Nine MJ, Choudhury D, Hee AC, Mootanah R, Osman NAA. 2014. Wear Debris Characteri-  
727 zation and Corresponding Biological Response: Artificial Hip and Knee Joints. *Materials*  
728 7:980-1016.
- 729 Pace HE, Rogers NJ, Jarolimek C, Coleman VA, Higgins CP, Ranville JF. 2011. Determin-  
730 ing transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single parti-  
731 cle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* 83:9361-9369.
- 732 Pascual E, Jovaní V. 2005. Synovial fluid analysis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 19:371-  
733 386.
- 734 Revell PA, al-Saffar N, Kobayashi A. 1997. Biological reaction to debris in relation to joint  
735 prostheses. *Proc Inst Mech Eng H* 211:187-197.
- 736 Richards L, Brown C, Stone MH, Fisher J, Ingham E, Tipper JL. 2008. Identification of na-  
737 nometre-sized ultra-high molecular weight polyethylene wear particles in samples retrieved  
738 in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 90:1106-1113.
- 739 Rodgers K, Klykken P, Jacobs J, Frondoza C, Tomazic V, Zelikoff J. 1997. Immunotoxicity  
740 of medical devices. Symposium overview. *Fundam Appl Toxicol* 36:1-14.
- 741 Roebben G, Rauscher H, Amenta V, Aschberger K, Sanfeliu AB, Calzolari L, et al. 2014.  
742 Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term "nanomaterial".
- 743 Schinwald A, Murphy F, Prina-Mello A, Poland C, Byrne F, Glass J, et al. 2012. The thresh-  
744 old length for fibre-induced acute pleural inflammation: shedding light on the early events in  
745 asbestos-induced mesothelioma. *Toxicol Sci* 128:461-70.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 746 Scott M, Widding K, Jani S. 2001. Do current wear particle isolation procedures underesti-  
747 mate the number of particles generated by prosthetic bearing components? *Wear* 251:1213-  
748 1217.
- 749 Šlouf M, Šloufová I, Horak Z, Štěpánek P, Entlicher G, Krejčík M, et al. 2004. New fast  
750 method for determination of number of UHMWPE wear particles. *J Mater Sci Mater Med*  
751 15:1267-1278.
- 752 Song Y, Li X, Du X. 2009. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmo-  
753 nary fibrosis and granuloma. *Eur Respir J* 34:559-567.
- 754 Song Y, Li X, Wang L, Rojanasakul Y, Castranova V, Li H, et al. 2011. Nanomaterials in  
755 humans: identification, characteristics, and potential damage. *Toxicol Pathol* 39:841-849.
- 756 Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. 2013. Rapid for-  
757 mation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nano-*  
758 *technol* 8:772-781.
- 759 Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. 2013. Rapid for-  
760 mation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nano-*  
761 *technol* 8:772-781.
- 762 Thrivikraman G, Madras G, Basu B. 2014. In vitro/In vivo assessment and mechanisms of  
763 toxicity of bioceramic materials and its wear particulates. *RSC Adv* 4:12763-12781.
- 764 Topolovec M, Cor A, Milosev I. 2014. Metal-on-metal vs. metal-on-polyethylene total hip  
765 arthroplasty tribological evaluation of retrieved components and periprosthetic tissue. *J Mech*  
766 *Behav Biomed Mater* 34:243-252.
- 767 Tsaousi A, Jones E, Case CP. 2010. The in vitro genotoxicity of orthopaedic ceramic  
768 (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and metal (CoCr alloy) particles. *Mutat Res* 697:1-9.

1 769 Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilovic J, Black J, Peoc'h M. 2000. Dissemination  
2 770 of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee  
3  
4 771 replacement. *J Bone Joint Surg Am* 82:457-476.  
5  
6  
7 772 Urban RM, Tomlinson MJ, Hall DJ, Jacobs JJ. 2004. Accumulation in liver and spleen of  
8  
9 773 metal particles generated at nonbearing surfaces in hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 19:94-  
10  
11 774 101.  
12  
13  
14 775 Vanhoe H. 1993. A review of the capabilities of ICP-MS for trace element analysis in body  
15  
16 776 fluids and tissues. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 7:131-139.  
17  
18  
19 777 von der Kammer F, Ferguson PL, Holden PA, Masion A, Rogers KR, Klaine SJ, et al. 2012.  
20  
21 778 Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): general  
22  
23 779 considerations and conceptual case studies. *Environ Toxicol Chem* 31:32-49.  
24  
25  
26 780 Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. 1960. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos expo-  
27  
28 781 sure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med* 17:260-271.  
29  
30  
31 782 Williams S, Tipper JL, Ingham E, Stone MH, Fisher J. 2003. In vitro analysis of the wear,  
32  
33 783 wear debris and biological activity of surface-engineered coatings for use in metal-on-metal  
34  
35 784 total hip replacements. *Proc Inst Mech Eng H* 217:155-163.  
36  
37  
38 785 Wu M, Gordon RE, Herbert R, Padilla M, Moline J, Mendelson D, et al. 2010. Case report:  
39  
40 786 Lung disease in World Trade Center responders exposed to dust and smoke: carbon nano-  
41  
42 787 tubes found in the lungs of World Trade Center patients and dust samples. *Environ Health*  
43  
44 788 *Perspect* 118:499-504.  
45  
46  
47 789 Xu M, Li J, Iwai H, Mei Q, Fujita D, Su H, et al. 2012. Formation of nano-bio-complex as  
48  
49 790 nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interac-  
50  
51 791 tions. *Sci Rep* 2:406.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

792 Yang SY, Ren W, Park Y, Sieving A, Hsu S, Nasser S, et al. 2002. Diverse cellular and apop-  
793 totic responses to variant shapes of UHMWPE particles in a murine model of inflammation.  
794 Biomaterials 23:3535-3543.

prosthesis	tissue	chemical treatment	physical treatment	analytical techniques	particle size (nm)	particle composition	Ref.
CoC	N/A	N/A	laser capture micro-dissection	SEM, TEM, EDX	46 (SEM), 5 (TEM)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Hatton et al. 2002
MoP	femoral	basic digestion, delipidation, ethanol induced protein precipitation	centrifugation, filtration	FEG-SEM, EDX	30	UHMWPE	Richards et al. 2008
MoM	N/A	enzymatic digestion, acetone, SDS, Tris-HCl	sonication, centrifugation	HRTEM, EDX, electron diffraction	40	CoCr, Cr, Ti	Milošev and Remškar 2009
MoM	pseudo-capsular, interfacial and femoral membranes	basic digestion	variable density sucrose gradient centrifugation, filtration	FESEM, EDX, BSE	20	CoCrMo, Ti	Topolovec et al. 2014
MoP	granulomatous	enzymatic digestion, SDS, Tris-HCl	centrifugation, sonication filtration	SEM	<100	UHMWPE	
MoP	synovial capsule, bone-implant interface	delipidation, acid digestion	freeze-drying, centrifugation, sonication, filtration	FTIR, EDX, FESEM,	18	UHMWPE	Lapcikova et al. 2009
MoP		typical EM preparation	typical EM preparation	TEM	<100	UHMWPE	Benz et al. 2001
MoM	pseudo-capsular, interfacial femoral and acetabular membranes	tissue sections: typical EM preparation extracted particles: delipidation, enzymatic digestion, SDS, Tris-HCl	typical EM preparation extracted particles: lyophilization, centrifugation, sonication	TEM, EDX	6 20	CoCrMo, Ti, Al, V	Doorn et al. 1998
MoM or MoP	lymph nodes	typical TEM or cryo-TEM preparation	typical TEM or cryo-TEM preparation	TEM	20	ZrO <sub>2</sub>	Bos and Johansson 2004

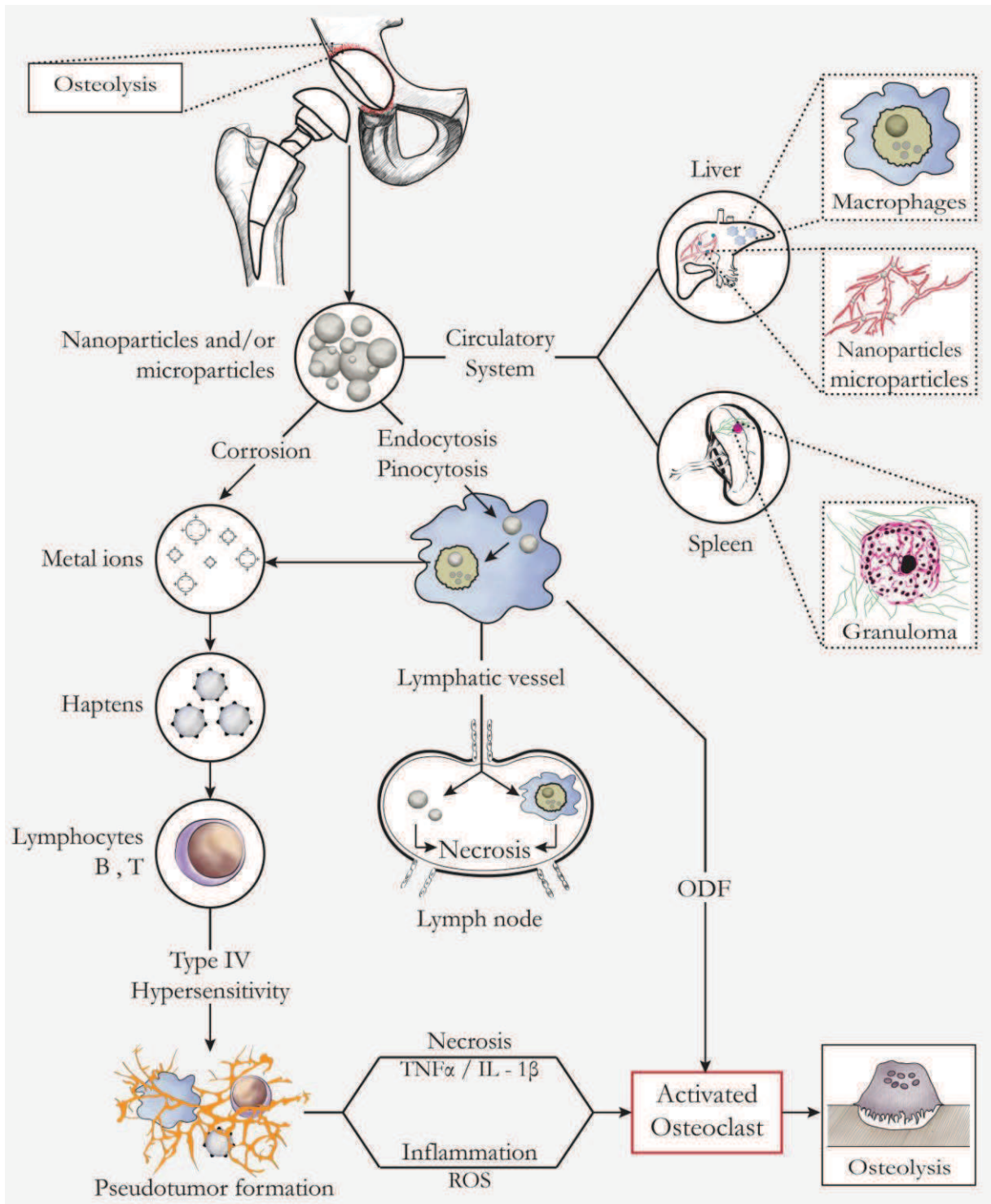
**Table 1. Summary of studies on the detection and analysis of nano-sized wear debris in periprosthetic samples.**

CoC, ceramic on ceramic; SEM, scanning electron microscope, MoP, metal on polyethylene; MoM, metal on metal; SDS, sodium dodecyl sulfate; HRTEM, high-resolution TEM.

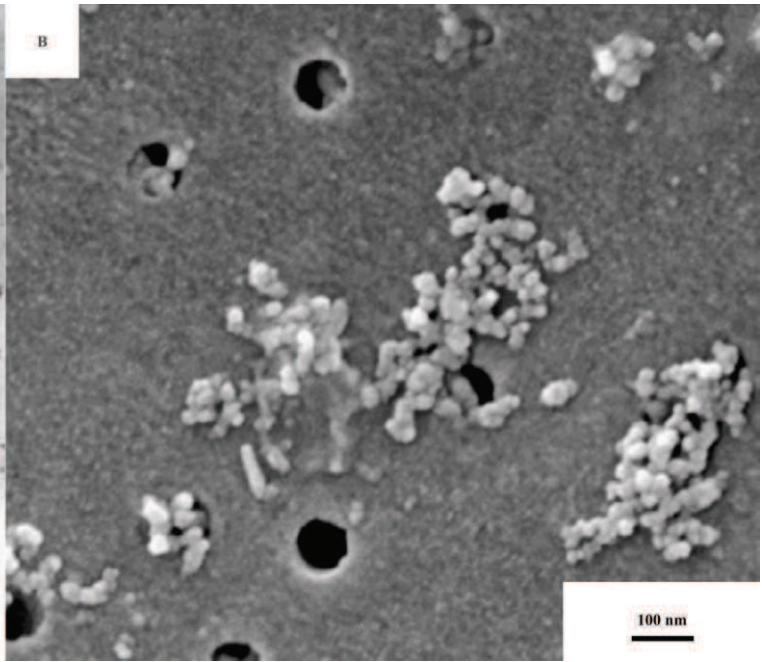
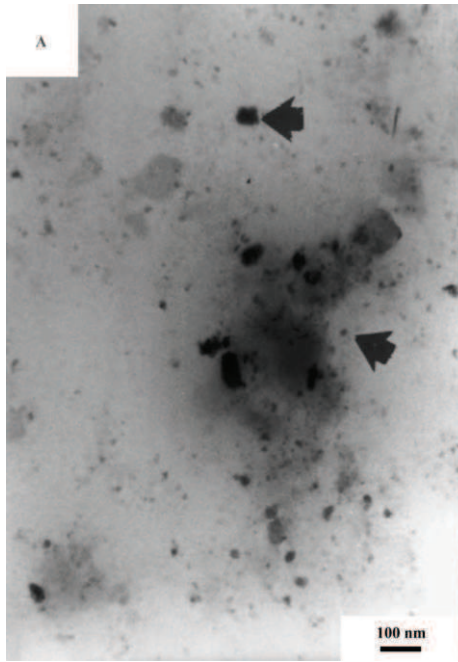
symptomatology (pathology where available)	specimen	chemical treatment	physical treatment	analytical techniques	particle size (nm)	particle composition	Ref.
diffused granuloma	liver biopsy	alcohol, xylol	20µ-thick sectioning	ESEM, EDX	>50	Au	Gatti and Rivasi 2002
ulcerative colitis, Crohn's disease, colon cancer	colon biopsies	alcohol, xylol	20µ-thick sectioning	ESEM, EDX, BSE	>30	Si, Al, Ca, Na, S, K, Fe, Ti, Ag	Gatti 2004
similar to: usual interstitial and nonspecific interstitial pneumonitis, hypersensitivity pneumonia	lung biopsies	basic digestion of paraffin embedded lung tissue	centrifugation	TEM	20-30	SWCNT	Wu et al. 2010
N/A	thrombi and tissue adherent to implanted vena cava filters	formaldehyde	microtome sectioning (unknown thickness)	ESEM, EDX	indistinguishable (organized in clusters)	C, O, Al, Si, S, K	Gatti et al. 2004
shortness of breath, pleural and pericardial effusion	chest fluid, broncho-alveolar lavage fluid, lung tissue	typical EM preparation	centrifugation	TEM	30	N/A	Song et al. 2009
shortness of breath, pleural and pericardial effusion	lung tissue, chest fluid	xylene, typical EM preparation	ultra-thin sectioning (50-80nm)	TEM, ICP-MS, AAS, EDX	2-20	SiO <sub>2</sub>	Song et al. 2011
deep vein thrombosis, abdominal cancer	thrombi and tissue adherent to implanted vena cava filters	N/A	5µ- and 10µ-thick sectioning	ESEM, EDX	≥100	various	Gatti and Montanari 2006

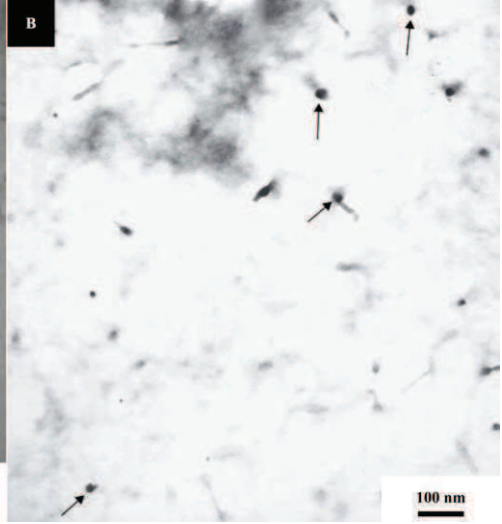
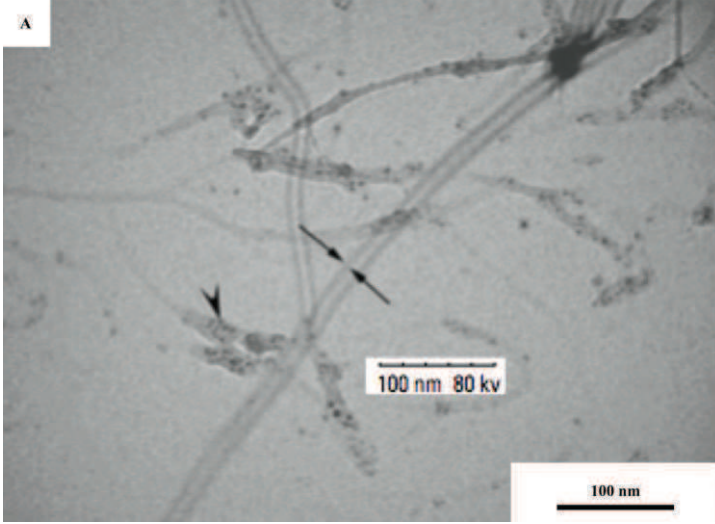
**Table 2. An overview of all available clinical studies that investigated the presence of nanoparticles in various human specimens.**

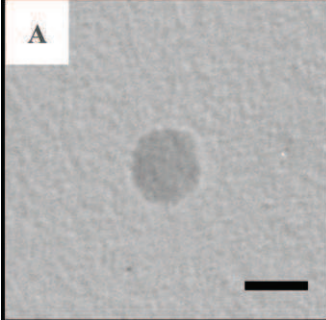
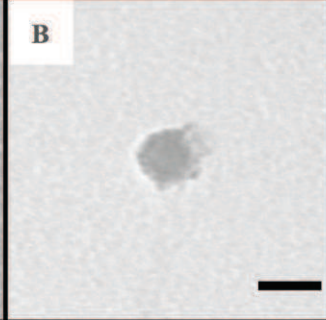
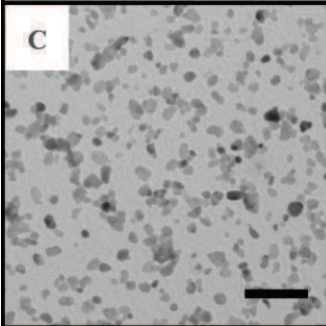
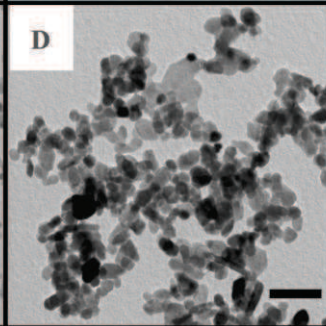
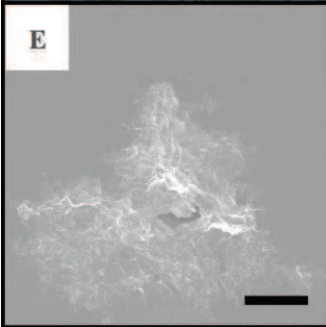
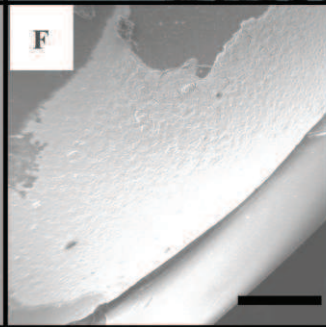
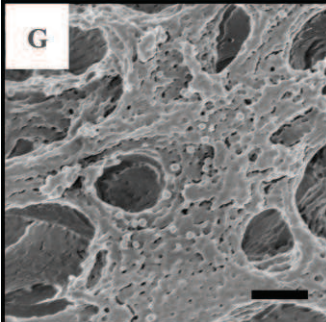
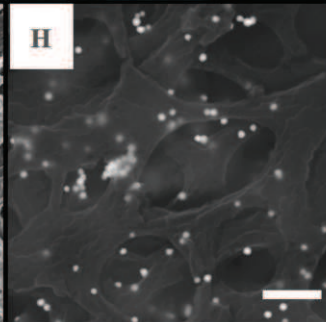










		<p><b>Step 1: Destruction of biological matter</b></p> <p>Extreme pH and oxidative potential values can lead to dissolution of certain particles, change their size distribution, surface chemistry and morphology.</p>
		<p><b>Step 2: Chemical treatment</b></p> <p>Various chemical agents (e.g., lysis buffers, salts and dispersants) can lead to dissolution of certain particles and change their size distribution and aggregation state.</p>
		<p><b>Step 3: Physical treatment</b></p> <p>Centrifugal forces and unsuitable storage conditions can lead to adherence of particles on container walls and to their eventual loss. Ultra-sonication can alter their aggregation state.</p>
		<p><b>Step 4: Filtration</b></p> <p>Particles interact with the network of filter membranes where they can get trapped and affect their measured amount and size distribution</p>

---

PARTIE EXPERIMENTALE

## **7 ETUDES DE BIODISTRIBUTION SUR MODELE ANIMAL**

Les deux travaux présentés dans ce chapitre ont eu pour objectif d'évaluer la biodistribution testiculaire de nanoparticules injectées par voie intramusculaire chez la souris.

Dans le cadre d'étude sur la biodistribution d'objets présentant une toxicité potentielle pour l'homme, l'utilisation d'un modèle animal semble être la seule option envisageable malgré les différences physiologiques (spermatogenèse plus courte) et histologiques (absence de septa) qui peuvent exister entre le testicule humain et les testicules de rongeurs. Les recommandations du comité d'éthique de Saint-Etienne ont été suivies et un nombre minimal d'animaux a été utilisé. Pour la seconde étude présentée dans ce chapitre une autorisation ministérielle a été demandée et obtenue, conformément à la loi. Le choix de la souris comme modèle semble le plus pertinent au regard de sa petite taille, de son faible coût et des similitudes qui existent entre le testicule murin et le testicule humain. Les principales différences sont une spermatogenèse plus courte, 35 jours au lieu de 74 jours chez l'homme, et l'absence de lobes dans le testicule murin. De plus la souris a été utilisée à de nombreuses reprises dans des études similaires<sup>42,43,46,48,54</sup>.

Le choix de la voie intramusculaire comme voie d'exposition présente deux avantages scientifiques certains. Tout d'abord c'est une voie qui n'avait jamais été explorée jusque-là dans le cadre de la biodistribution testiculaire des nanoparticules. Ensuite c'est une voie par laquelle les hommes sont exposés aux nanoparticules du fait de l'utilisation croissante de celles-ci comme adjuvants vaccinaux<sup>40,163,164</sup>. De plus nous avons par ce choix la possibilité de reprendre le modèle développé par l'équipe du Pr Romain Gherardi à Créteil (U955-E10) et ainsi de débiter une nouvelle collaboration.

### **7.1 BIODISTRIBUTION TESTICULAIRE DE PARTICULES DE LATEX**

#### **FLUORESCENTES DE 450 NM APRES INJECTION INTRAMUSCULAIRE CHEZ LA SOURIS.**

Ce travail avait pour objectif :

- D'évaluer la capacité des particules étudiées à atteindre le testicule après injection intramusculaire.
- Dans les cas où des nanoparticules sont observées dans le testicule, d'analyser leur distribution intra-testiculaire.

- De voir si les macrophages pouvaient être responsables du transport de ces nanoparticules vers le testicule.

Pour ce travail, nous avons ainsi bénéficié d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Romain Ghérardi à Créteil qui s'est intéressé à la biodistribution systémique et cérébrale de particules d'hydroxyde d'aluminium  $\text{Al}(\text{OH})_3$  utilisées comme adjuvants vaccinaux. Dans ce but, ils ont étudié la biodistribution de particules fluorescentes après injection intramusculaire chez la souris. Les particules modèles utilisées ont été soit des billes de latex fluorescentes de 450 nm, soit des particules d'hydroxyde d'aluminium avec un cœur en rhodamine dont la taille pouvait varier entre 100 nm et 1  $\mu\text{m}$ . Nous avons réalisé notre étude avec les testicules des souris qui ont été traitées avec les billes de latex. En effet ces billes ont l'avantage d'être mieux caractérisées et de présenter une fluorescence plus stable et plus intense. De plus, par rapport à des particules plus petites, ces billes sont visibles de façon unitaire au niveau du parenchyme testiculaire et leur aspect typique nous a permis de bien les différencier de l'autofluorescence testiculaire, très importante dans certaines portions du testicule.

Ce travail a ainsi montré que des particules fluorescentes de 450 nm injectées par voie intramusculaire chez la souris étaient capables d'atteindre le testicule en petite quantité (environ une particule pour  $10^7$  injectées) par l'intermédiaire de la circulation sanguine. Ces particules étaient disposées essentiellement à proximité des vaisseaux au sein de l'espace sous-albuginéen et dans les espaces inter-tubulaires. Elles ne semblaient pas interagir avec les macrophages du testicule.



# Testicular biodistribution of 450 nm fluorescent latex particles after intramuscular injection in mice

J.-P. Klein · D. Boudard · J. Cadusseau · S. Palle · V. Forest · J. Pourchez · M. Cottier

Published online: 18 January 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** The significant expansion in the use of nanoparticles and submicron particles during the last 20 years has led to increasing concern about their potential toxicity to humans and particularly their impact on male fertility. Currently, an insufficient number of studies have focused on the testicular biodistribution of particles. The aim of our study was to assess the distribution of 450 nm fluorescent particles in mouse testes after intramuscular injection. To this end, testes were removed from 5 groups of 3 mice each at 1 h (H1), 4 days (D4), 21 days (D21), 45 days (D45) and 90 days (D90) after the injection of  $7.28 \times 10^9$  particles in the tibialis anterior muscles of each mouse. We examined histological sections from these samples by epifluorescence microscopy and confocal microscopy and identified testicular biodistribution of a small number of particles in groups H1, D4, D21, D45 and D90. Using CD11b immunostaining, we showed that particles were not carried into the testis by macrophages. The intratesticular repartition of particles

mainly followed testicular vascularization. Finally, we found some particles in seminiferous tubules but could not determine if the blood–testis barrier was crossed.

**Keywords** Submicron particles · Mice · Testis · Tissue distribution · Intramuscular injections · Macrophages

## 1 Introduction

Humans have always been exposed to nanoparticles and submicron particles in the environment through volcanic eruptions, forest fires or sand dust; however, environmental exposure has increased in recent history due to industrial activities and car pollution (Gaffet 2011). Moreover, during the last 20 years we have witnessed the emergence of nanotechnologies that have already found many applications in a wide variety of fields, such as textile industry, informatics, cosmetic or medicine.

J.-P. Klein · D. Boudard · V. Forest · J. Pourchez · M. Cottier  
LINA, EA 4624,  
42023 Saint-Etienne, France

J.-P. Klein (✉) · D. Boudard · M. Cottier  
Faculté de Médecine, Université Jean Monnet,  
42023 Saint-Etienne, France  
e-mail: jeanphiklein@hotmail.fr

J.-P. Klein · D. Boudard · V. Forest · J. Pourchez · M. Cottier  
SFR IFRESIS,  
42023 Saint-Etienne, France

J.-P. Klein · D. Boudard · S. Palle · M. Cottier  
Université de Lyon,  
42023 Saint-Etienne, France

J.-P. Klein · D. Boudard · M. Cottier  
CHU de Saint-Etienne,  
42055 Saint-Etienne, France

J. Cadusseau  
Inserm U955, Equipe 10,  
Université Paris Est Créteil (UPEC),  
94010 Créteil, France

S. Palle  
Centre de Microscopie Confocale Multiphotonique,  
Pôle Optique et Vision, Université Jean Monnet,  
42023 Saint-Etienne, France

V. Forest · J. Pourchez  
Ecole Nationale Supérieure des Mines,  
CIS-EMSE, LINA EA 4624,  
42023 Saint-Etienne, France



These new developments have led to increased exposure to engineered nanoparticles and nanomaterials. Nanoparticles have specific abilities to interact with biological structures mainly due to their small size and their high surface to volume ratio (Oberdörster et al. 1994). Thus, concerns about nanoparticle toxicity have been raised in the scientific community, and many studies have been done to assess the impact of nanoparticles on the environment and human health (Peralta-Videa et al. 2011).

Numerous pollutants, such as phthalate esters (Lucas et al. 2009), pesticides (Colborn and Carroll 2007) and bisphenol A (Chitra et al. 2003) may have an impact on human reproduction. Since nanoparticles can pass through biological membranes, especially the blood–air barrier (Nemmar et al. 2001; Oberdörster et al. 2002), or are directly injected into the blood circulation in some medical procedures, including new treatments for cancer (Schwartz et al. 2009) and for biomedical imaging (Bruns et al. 2009), fears have been raised about their ability to impair human reproduction, especially male fertility (Ema et al. 2010; Lan and Yang 2012).

At this time few studies have focused on this topic. Due to a lack of standardization, it is quite difficult to draw conclusions, with some studies even leading to contradictory results. Two types of investigation were carried out in the studies reported in literature: a determination of the biodistribution of nanoparticles in the testis and an assessment of the toxicity of nanoparticles on testicular cells.

Testicular biodistribution of nanoparticles has only been only studied in rodent models (Bai et al. 2010; Balasubramanian et al. 2010; De Jong et al. 2008; Kim et al. 2006; Kwon et al. 2008; Lankveld et al. 2010; Park et al. 2010). Although animals (mice and rats), exposure routes (intravenous, intraperitoneal, oral or respiratory) and physico-chemical properties of nanoparticles (silica, gold nanoparticles, silver nanoparticles and carbon nanotubes with a size between 10 and 323 nm) have differed, all studies have concluded that nanoparticles are able to reach the testis.

Testicular toxicity has been investigated using cell lines or animal models. In a spermatogonial stem cell model (C18-4), it was shown that regardless of the cell viability marker considered (mitochondrial function, lactate dehydrogenase leakage, apoptosis or necrosis assay), the nanoparticle form of an element (silver, molybdenum and aluminum) is more toxic than the soluble form (silver carbonate, sodium molybdate and aluminum chloride) (Braydich-Stolle et al. 2005). In a Leydig cell model (TM3) another study concluded that nanoparticles can affect steroidogenesis through the overexpression of some genes such as the steroidogenic acute regulatory gene (*StAR*) (Komatsu et al. 2008). In another study, 200 nm titanium dioxide particles increased mouse testis cell proliferation while silver nanoparticles appeared to be rather cytostatic as well as cytotoxic (Asare et al. 2012). In human spermatozoa, two studies found contradictory results, the first

one showed that nanoparticles had no effect on the ability of spermatozoa to initiate acrosomic reaction and did not affect their motility (Ben-David Makhluif et al. 2006), while the second one found that gold nanoparticles lowered spermatozoon motility (Wiwanitkit et al. 2009). However, the latter study had some biases and is hard to interpret. In mice, intratracheally administered carbon black nanoparticles seem to impair spermatogenesis while increasing testosterone synthesis (Yoshida et al. 2009). Additionally, repeated intravenous injections of carbon nanotubes in mice caused testicular damage that was reversible after injections were discontinued and did not affect fertility (Bai et al. 2010). In rats, inhalation of a specific amount of diesel exhaust nanoparticles disrupted the endocrine activity of the male reproductive system by increasing plasma and testicular testosterone and inhibin levels (Li et al. 2009). This could be explained by increased expression of *StAR* protein and P450 cytochrome (Ramdhan et al. 2009).

Since nanoparticles and submicron particles are increasingly used in medicine, especially as a vaccine adjuvant (Oyewumi et al. 2010; Singh et al. 2007; Peek et al. 2008), the aims of our study were to test whether particles could reach the testis following an intramuscular injection in a murine model and, if so, to track them inside the testis. Because macrophages are known to incorporate foreign bodies through phagocytosis and carry them towards various organs, we used fluorescent macrophage immunostaining to investigate whether macrophages could carry particles towards the testis. In order to observe individual particles with epifluorescence microscopy, we chose 450 nm fluorescent particles. Although this size exceeds the usual size of nanoparticles, which is less than 100 nm (Handy et al. 2008), it still accords with the size of medical substances that are injected by the intramuscular route such as vaccine adjuvants (Oyewumi et al. 2010; Singh et al. 2007; Peek et al. 2008).

## 2 Materials and methods

### 2.1 Animals

Nineteen male C57BL6 mice (Centre d'Élevage René Janvier, France) were bred at the animal house of the Créteil Medicine University and used according to French law. Experiments were started between 6 and 8 weeks of age.

### 2.2 Particles

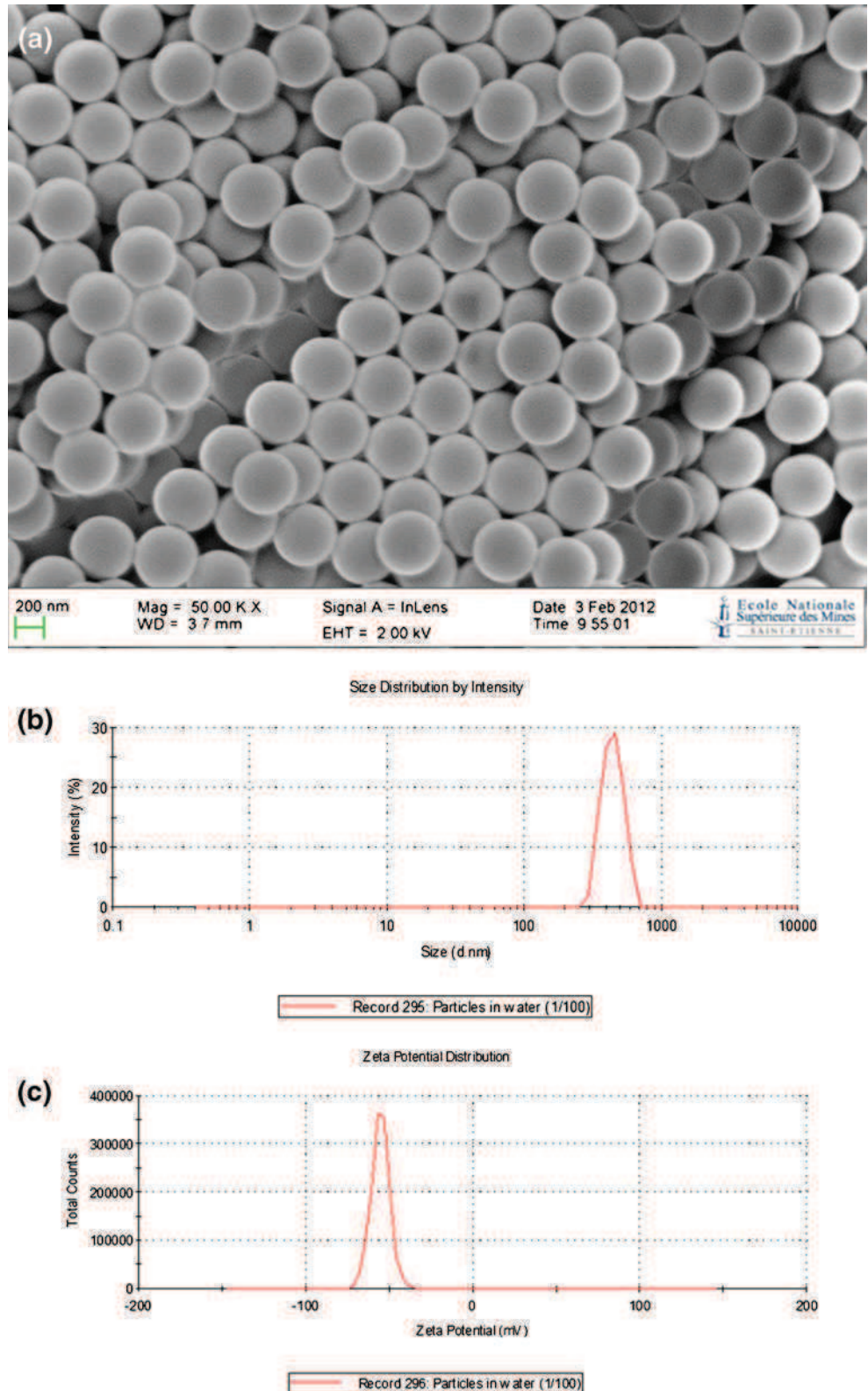
We used Fluoresbrite® Polychromated Red Microspheres provided by Polysciences, Inc. (France). Their maximal excitation wavelength is 529 nm, while their maximal emission wavelength is 546 nm. The original concentration was  $3.64 \times 10^{11}$  particles/mL. Particles were characterized using scanning

electron microscopy (Fig. 1a) and photon correlation spectroscopy (Fig. 1b and c). Particle size was approximately 450 nm with very few variations. No particle agglomeration was observed. Particle zeta potential was around  $-50$  mV.

### 2.3 Intramuscular injection of particles

Particles were diluted 1:2 in phosphate-buffered saline (PBS), and 20  $\mu$ L of the diluted particles was injected in

**Fig. 1** Particle characterization. **a** Particles observed in scanning electron microscopy,  $\times 50,000$ . **b** Size distribution and **c** zeta potential of particles in photon correlation spectroscopy



each tibialis anterior muscle of 15 mice, for a total amount of  $7.28 \times 10^9$  particles per mouse. Four other mice were injected with PBS alone as a negative control group.

#### 2.4 Blood and testicular samples

The 15 mice that were injected with particles were divided into 5 groups that were sacrificed at 1 h (H1), 4 days (D4), 21 days (D21), 45 days (D45) or 90 days (D90) after the injection. Control group mice were sacrificed after 1 h. Mice were first anesthetized with a lethal dose of sodium pentobarbital (120 mg/kg, Ceva Sante Animal SA, France). The chest was then opened, 100  $\mu$ L of blood was sampled from the right ventricle and spread on several glass slides. The bloodstream was perfused with PBS and tissues were fixed with a 4 % paraformaldehyde (PFA) solution. Once the first fixation was done, testes were excised and fixed in a 4 % PFA solution for 4 h, after which they were cryoprotected in a 30 % sucrose solution for 24 h. After being coated in a cryopreservative solution (Tissue-Tech<sup>®</sup>: Sakura, Netherlands), testes were frozen in liquid nitrogen ( $-196$  °C) and stored at  $-80$  °C.

#### 2.5 Histological slide preparation

Each slide (Superfrost Plus<sup>®</sup>: Thermo Scientific) was wiped with an alcohol swab to remove any dust that could cause unwanted fluorescence. Eleven 10- $\mu$ m-thick sections were cut from one testis of each mouse with a microtome (Leica CM 3000<sup>®</sup>). Sections were not adjacent and have been cut from different part of the testis. As mouse testis is a homogeneous organ, it was assessed that each section was representative of the whole testis. One section was stained with toluidine blue in order to assess preservation of the testes. Five sections were dried and mounted with an appropriate mounting medium (Fluokeep<sup>®</sup>: Argene, France) and the five remaining sections were immunostained. Once mounted, slides were stored at 4 °C in the dark.

#### 2.6 Macrophage staining

Anti-CD11b antibody specifically labels the plasma membrane of macrophages. To determine if nanoparticles were carried to testis by macrophages or were free in the testicular stroma, we performed an indirect immunofluorescence procedure using a specific monoclonal rat anti-mouse anti-CD11b antibody (clone 5C6, Adb Serotec, United Kingdom). First, slides were washed in PBS containing 0.5 % Triton X-100 (PBST) for 5 min and pre-incubated in a blocking solution of PBST containing 3 % bovine serum albumin for 15 min. Slides were then incubated for 1 h in a humid chamber with the anti-CD11b primary antibody diluted 1:200 in antibody diluent (Dako, France). After rinsing in PBST and then PBS, slides were incubated for 30 min with a polyclonal goat anti-

rat secondary antibody (Adb Serotec, United Kingdom) conjugated with green fluorescent dyes (Dylight<sup>®</sup> 488) and diluted 1:200. Finally, they were rinsed in PBST, PBS and pure water one last time before application of Fluokeep medium and storage at 4 °C in a dark place until analysis.

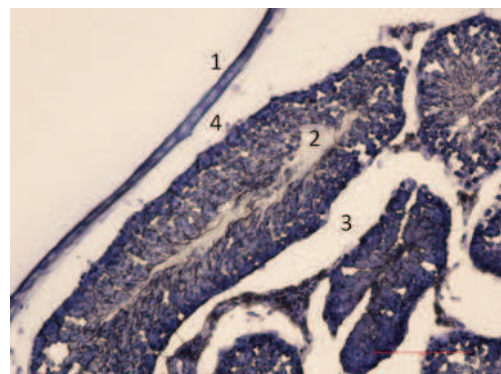
#### 2.7 Epifluorescence microscopy and confocal microscopy

Slides were observed using an epifluorescence microscope (motorized Olympus Ix81) to detect particles (excitation: 554 nm, emission: 568 nm) and to analyze CD11b labeling (excitation: 490 nm, emission: 520 nm). In order to differentiate particles from fluorescent dust or from free dyes, we compared their aspect with a sprawl of isolated microspheres and defined several morphological criteria such as an appropriate size and a spherical shape. Autofluorescence in the testis was a major issue throughout the study, and it made particle observations particularly difficult. To ensure that observed particles were really the injected submicron particles and not autofluorescence, confocal microscopy was performed to establish the emission spectra of autofluorescent areas of the testis compared with pure submicron particles. To that purpose, both the autofluorescent areas and the particles were excited at 800 nm, and fluorescence was then measured between 350 nm and 840 nm. A comparison of the different emission spectra allowed us to distinguish injected particles from autofluorescence.

### 3 Results

#### 3.1 Preservation of testes

Analysis of slides stained with toluidine blue showed that testicular morphology was well preserved (Fig. 2).



**Fig. 2** Mouse testis stained with toluidine blue in optical microscopy,  $\times 200$ . (1) Tunica albuginea; (2) seminiferous tubules; (3) interstitial spaces; (4) sub-albuginea spaces. Testicular structures were well preserved



### 3.2 Blood Analysis

Fluorescent submicron particles were observed on blood smears at each survival time analyzed, with a maximum at D21 (Fig. 3).

### 3.3 Testicular autofluorescence

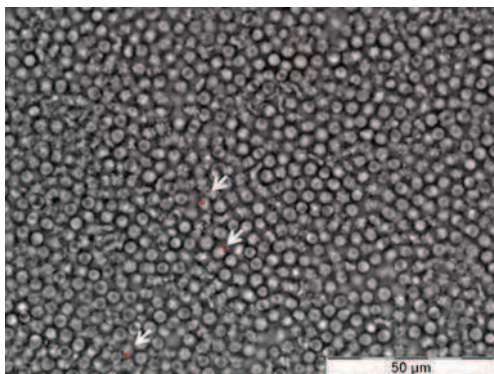
The first finding in the epifluorescence analysis of the testicular sections was the presence of significant autofluorescence (Fig. 4a). It was particularly intense in the intertubular compartment where Leydig cells lie (Fig. 4b). Interstitial autofluorescence sometimes hardly differed from the particles' fluorescence (Fig. 4c). Although tubular autofluorescence was less pronounced, some of the seminiferous tubules showed intense adluminal fluorescence (Fig. 4d). We found that this autofluorescence was emitted by spermatozoa heads at the end of spermatogenesis.

### 3.4 Particle biodistribution

Up to 190 sections were thoroughly analyzed, 40 sections from the control group and 30 sections from each of the other groups. All slides considered, 50 particles were found. No particles were found in the control group, 22 were found in the H1 group, 5 in the D4 group, 6 in the D21 group, 14 in the D45 and only 3 in the D90 group (Table 1).

Using morphological analysis, we were able to differentiate four histological compartments: the tunica albuginea, sub-albuginea spaces, interstitial spaces and seminiferous tubules (Fig. 2). Twenty-three particles were located in the tunica albuginea (Fig. 5a) or in sub-albuginea spaces (Fig. 5b), 15 particles in interstitial spaces (Fig. 5c) and 8 in seminiferous tubules (Fig. 5d). Due to poor section quality, we were not able to precisely localize 4 of the 50 particles.

Intra-testicular particle distribution analysis based on the time post-injection revealed that H1 and D4 particles were



**Fig. 3** Epifluorescence observation of D4 mice blood showing three fluorescent particles; red spectrum and brightfield,  $\times 600$

more likely to be located in the tunica albuginea, while their distribution was more uniform at later time points. In particular, some particles were located in seminiferous tubules at D21 and D45.

### 3.5 Macrophage staining

Twenty-two particles were found in the testicular sections stained with the anti-CD11b antibody (Table 2). Among them, 15 were found to be distant from macrophages (Fig. 6b and c) while 7 were in contact with macrophages (Fig. 6d). No particle seemed to be internalized by macrophages (particles and CD11B staining colocalization). These observations were irrespective of the time of analysis. Indeed, particles that reached the testis were mainly free, even at late time points after the injection.

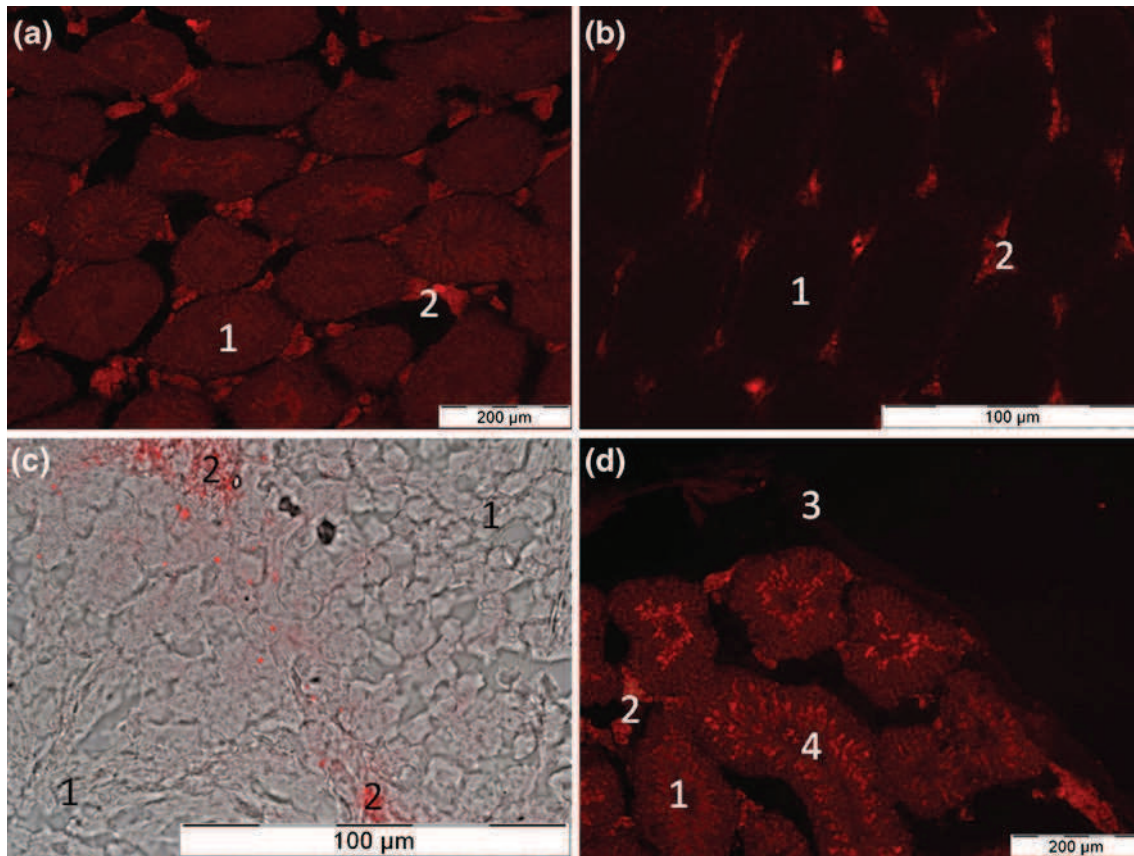
### 3.6 Emission spectra analysis

In order to distinguish fluorescent submicron particles from testicular autofluorescence, their emission spectra were established using confocal microscopy. We found that autofluorescent tissues had a small and wide emission peak between 460 nm and 710 nm (Fig. 7a), while submicron particles exhibited a higher and thinner emission peak between 520 nm and 690 nm (Fig. 7b). Eventually, the emission spectrum of particles found in mouse testes was the same as control submicron particles (Fig. 7c), thus we were able to conclude with confidence that observed particles were the injected submicron particles and not an autofluorescent artifact.

## 4 Discussion

In this study we chose to use submicron particles rather than ones that were strictly nanoparticles. Since microscopy is the only way to study intratesticular biodistribution of particles and since the maximal resolution of optical microscopy is 200 nm (Hell et al. 2004), the use of larger particles was legitimate. Moreover, larger particles allowed us to track single particle uptake inside cells when only one particle was included.

The aim of our study was first to assess if intramuscularly injected nanoparticles were able to reach the testis through blood circulation. We demonstrated not only that 450 nm particles could translocate from muscles to blood circulation but also that a small amount of them could reach the testes. This result appears to conflict with findings by De Jong et al. (2008) which showed that only particles smaller than 50 nm could reach the testis. Differences between animal models, injection routes or nanoparticle structures could explain these divergent results, and another reason could



**Fig. 4** Autofluorescence of control mice testes sections observed in epifluorescence microscopy. **a**, **b** and **d** red spectrum,  $\times 100$ ; **c** red spectrum and brightfield,  $\times 600$ . (1) Seminiferous tubules; (2) interstitial spaces; (3) tunica albuginea; (4) spermatozoa in lumen of the tubules

be a lack of sensitivity of the inductively coupled plasma and mass spectroscopy (ICP-MS) used in their study. They were able to detect particles from  $10^4$  particles per gram of organ, while we were able to observe individual particles. The aim of our study was not to quantify the number of particles that were able to reach testis. Indeed we only observed a small part of each testis as fluorescence microscopy is not well suited to study whole testes from several mice. However, we found that there were very few particles

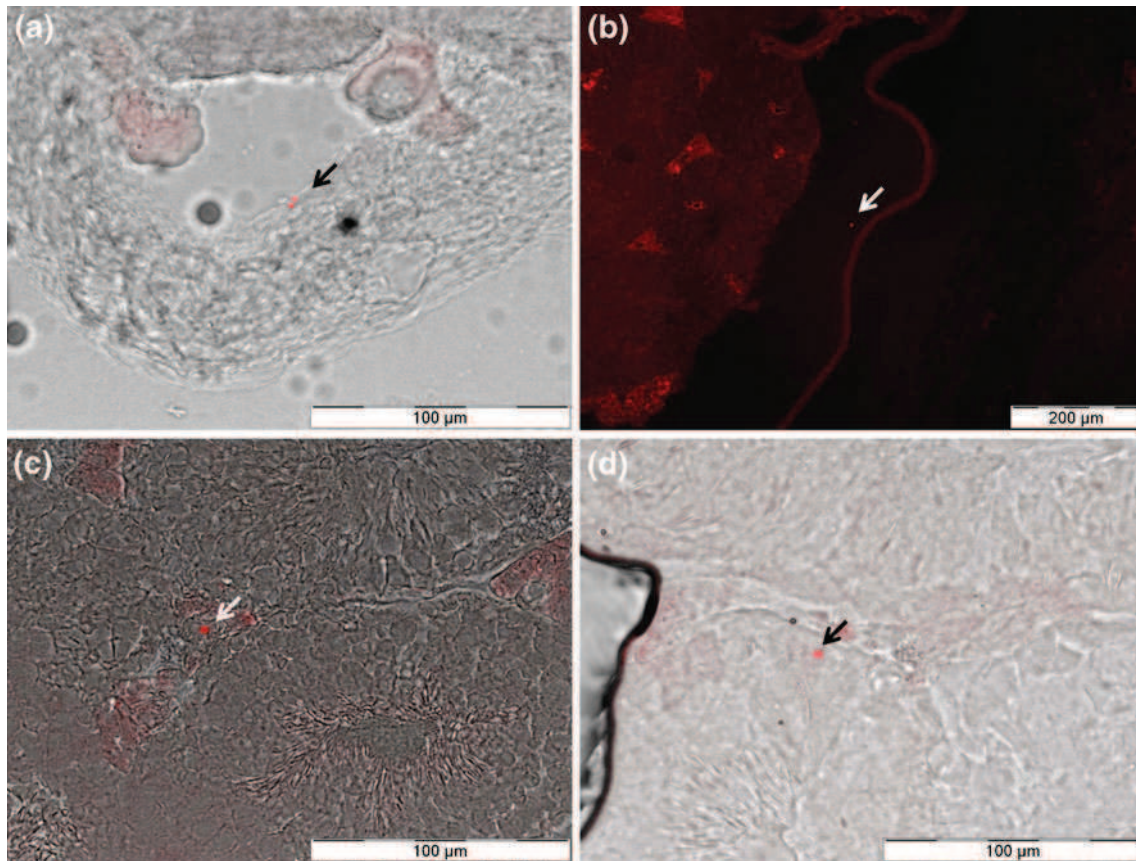
in the testes; even if we slightly underestimated it due to the technique we performed, such a small number would be undetectable by ICP-MS. Finally, our findings match the results described by De Jong et al. (2008), Lankveld et al. (2010) and Balabrasumian et al. (2010).

However, our results completely conflict with those of Kim et al. (2006) and Kwon et al. (2008). In these two studies, led by the same research group, it was shown in a mouse model that fluorescent 50 nm nanoparticles strongly

**Table 1** Number of particles found in the different parts of mice testes

	Control group ( $n=40$ )	Time of sacrifice after injection				
		H1 ( $n=30$ )	D4 ( $n=30$ )	D21 ( $n=30$ )	D45 ( $n=30$ )	D90 ( $n=30$ )
Tunica albuginea and sub-albuginea spaces	0	16	1	1	5	0
Interstitial spaces	0	4	3	2	5	1
Seminiferous tubules	0	1	0	3	4	0
Unknown	0	1	1	0	0	2
Total	0	22	5	6	14	3

$n$  number of sections observed, (H1) 1 h, (D4) 4 days, (D21) 21 days, (D45) 45 days, (D90) 90 days



**Fig. 5** Epifluorescence microscopy observation of mouse testis showing fluorescent particles. **a, c and d** red spectrum and brightfield,  $\times 400$ ; **b** red spectrum,  $\times 100$ . **a** H1 group, 2 particles in the tunica albuginea; **b**

D21 group, 1 particle in sub-albuginea space; **c** D4 group, 1 particle in interstitial space; **d** D21 group, 1 particle in a seminiferous tubule

migrate to the testis by both injection and inhalation routes. Kim et al. (2006) even suggested that particles could cross the blood–testis barrier based on the observation of adluminal fluorescence. Even if these discrepancies could be explained by the smaller size of their particles, it would be interesting to have the spectra analysis of the fluorescence they observed as we previously saw that the testis shows an intense autofluorescence in intertubular spaces and in the adluminal part of seminiferous tubules. Moreover, particles used in those studies had a smaller size than the resolution of

an optical microscope which is around 200 nm (Hell et al. 2004). Thus, in these experimental conditions, it seems it would be difficult to observe 50 nm individual particles and to distinguish them from testicular autofluorescence. In our study, we analyzed the emission spectra of particles and the testis in order to distinguish particles from testicular autofluorescence.

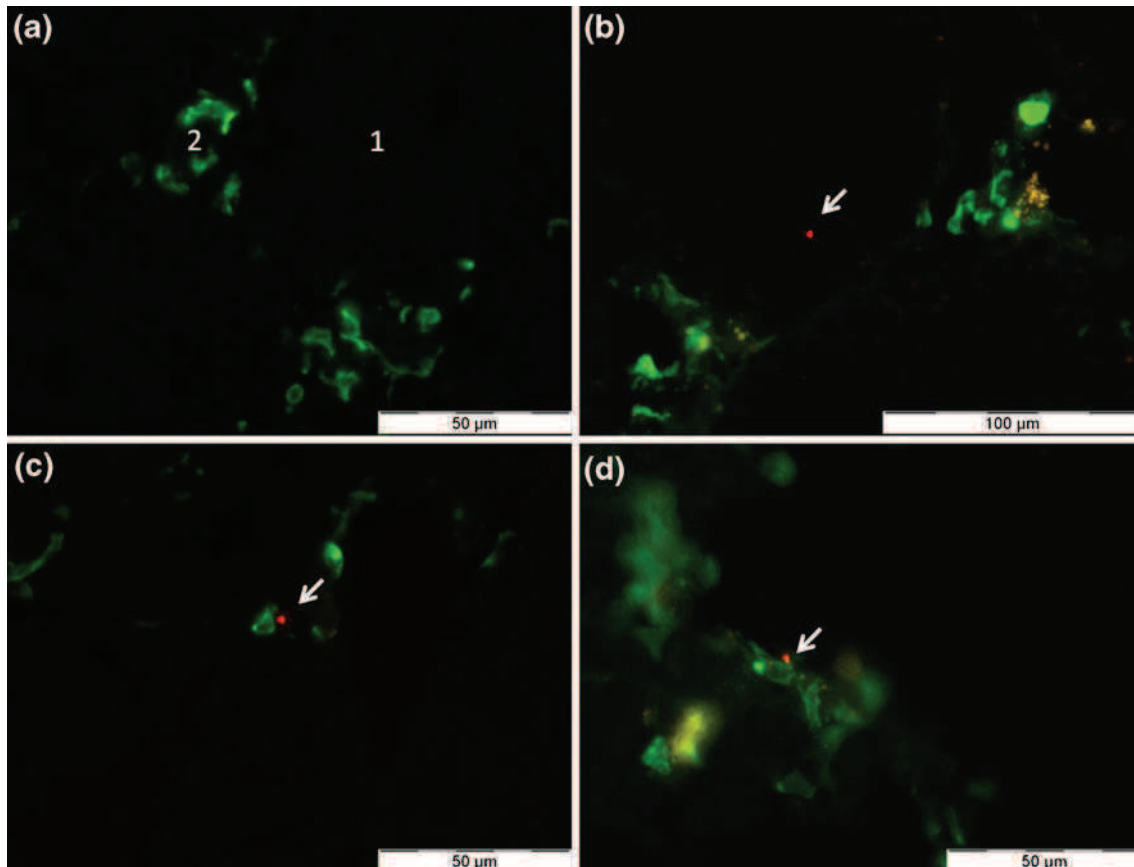
Most of the particles were observed in the testis 1 h after injection. This means that some of the particles quickly left muscles to reach the blood circulation and, from there, to

**Table 2** Number of particles found in mouse testes according to their distance from macrophages

Distance from macrophages	Control group ( $n=10$ )	Time of sacrifice after injection					Total ( $n=85$ )
		H1 ( $n=15$ )	D4 ( $n=15$ )	D21 ( $n=15$ )	D45 ( $n=15$ )	D90 ( $n=15$ )	
Far	0	8	0	1	5	1	15
In contact	0	2	3	0	0	2	7
Inside	0	0	0	0	0	0	0

$n$  number of sections observed, (H1) 1 h, (D4) 4 days, (D21) 21 days, (D45) 45 days, (D90) 90 days





**Fig. 6** Testicular sections after macrophage immunostaining with a green fluorescent dye. Spectrum red and green,  $\times 400$ . **a** Control group, macrophages only lie in interstitial spaces and sub-albuginea spaces, not in seminiferous tubules; **b** D45 group, a particle in a seminiferous

tubule far from macrophages; **c** H1 group, a particle in interstitial space but still at a distance from macrophages; **d** D90 group, a particle in contact with a macrophage. (1) Seminiferous tubules, (2) interstitial spaces

enter the testis. During the following days, only a few of particles stayed in the testis, while the others were most likely eliminated through blood circulation.

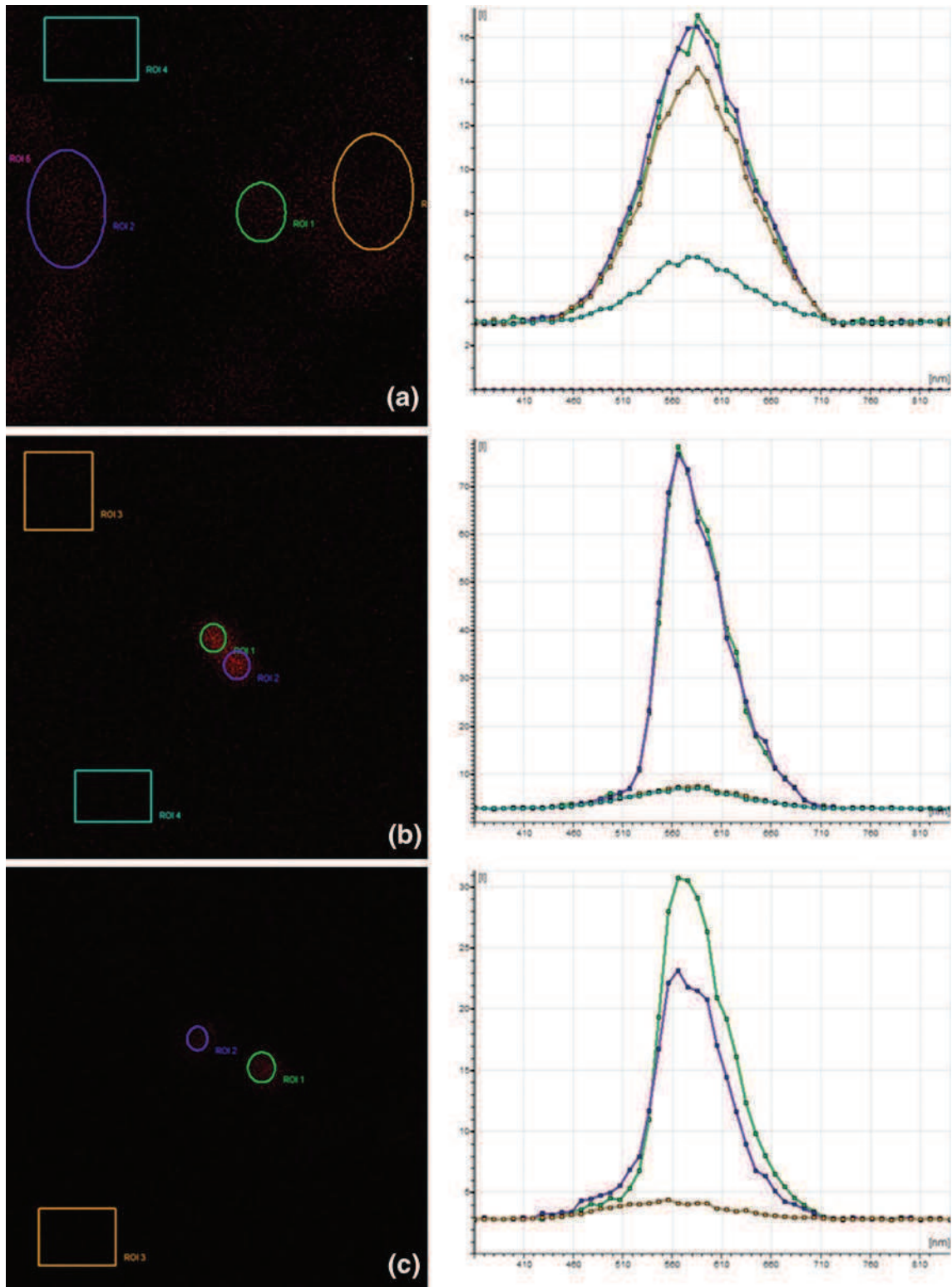
Our second objective was to determine intra-testicular distribution of the particles. While most of the testis is composed of seminiferous tubules, nearly half of the particles were found in albuginea or in sub-albuginea space and more than a quarter were found in interstitial spaces, especially soon after injection (H1, D4). This distribution is not surprising because it perfectly matches testicular vascularization. In fact, it shows that particles were carried towards the testis by the bloodstream. While some particles were found in the seminiferous tubules, especially at later time points, it is impossible to conclude that particles crossed the blood–testis barrier without examination by electron microscopy.

Our third objective was to investigate the macrophages' ability to carry particles from muscle towards the testis. Our hypothesis was that macrophages could serve as “Trojan horses” for particles to enter the testis. As described in

literature, macrophages are only found in interstitial spaces (Hume et al. 1984). However, no particles were found inside macrophages and only a few were even found close to macrophages. Moreover, the highest number of particles in the testis was observed 1 h after injection, when there were many free particles in the bloodstream. Although it is still possible that macrophages may have carried particles to the testis and unloaded them there, our observations do not confirm the Trojan horse hypothesis.

In conclusion, we have shown that 450 nm particles injected intramuscularly in a murine model can reach the testis through blood circulation in very small numbers, and they are probably not carried by macrophages. We also showed that intratesticular repartition of particles mainly follows testicular vascularization. We found some particles in seminiferous tubules without being able to determine if the blood–testis barrier was crossed. Thus, complementary studies, probably including the use of electron microscopy, are needed to answer to this question.





**Fig. 7** Analysis of emission spectra in confocal microscopy. *Left*: observed section and analyzed areas. *Right*: emission spectra from 350 nm to 840 nm. **a** Control group; **b** control particles; **c** observed particles

**Acknowledgments** Special thanks to the members of the nephrology laboratory of Saint-Etienne north hospital, especially Brigitte Roman, for their help during slide production and to the members of the BIIGC laboratory, especially Zhiguo He, for their help with epifluorescence microscopic analysis.

## References

- N. Asare, C. Instanes, W.J. Sandberg, M. Refsnes, P. Schwarze, M. Kruszewski, G. Brunborg, *Toxicology* **291**, 65 (2012)
- Y. Bai, Y. Zhang, J. Zhang, Q. Mu, W. Zhang, E.R. Butch, S.E. Snyder, B. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **5**, 683 (2010)
- S.K. Balasubramanian, J. Jittiwat, J. Manikandan, C.-N. Ong, L.E. Yu, W.-Y. Ong, *Biomaterials* **31**, 2034 (2010)
- S. Ben-David Makhluif, R. Qasem, S. Rubinstein, A. Gedanken, H. Breitbart, *Langmuir* **22**, 9480 (2006)
- L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J.J. Schlager, M.-C. Hofmann, *Toxicol. Sci.* **88**, 412 (2005)
- O.T. Bruns, H. Itrich, K. Peldschus, M.G. Kaul, U.I. Tromsdorf, J. Lauterwasser, M.S. Nikolic, B. Mollwitz, M. Merkel, N.C. Bigall, S. Sapra, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Weller, A. Eychmüller, G. Adam, U. Beisiegel, J. Heeren, *Nat. Nanotechnol.* **4**, 193 (2009)
- K.C. Chitra, K.R. Rao, P.P. Mathur, *Asian J. Androl.* **5**, 203 (2003)
- T. Colborn, L.E. Caroll, *Hum. Ecol. Risk Assess.* **13**, 1078 (2007)
- M. Ema, N. Kobayashi, M. Naya, S. Hanai, J. Nakanishi, *Reprod. Toxicol.* **30**, 343 (2010)
- E. Gaffet, *C. R. Phys.* **12**, 648 (2011)
- R.D. Handy, F. Kammer, J.R. Lead, M. Hassellöv, R. Owen, M. Crane, *Ecotoxicology* **17**, 287 (2008)
- S.W. Hell, M. Dyba, S. Jakobs, *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 599 (2004)
- D.A. Hume, D. Halpin, H. Charlton, S. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4174 (1984)
- W.H. De Jong, W.I. Hagens, P. Krystek, M.C. Burger, A.J.A.M. Sips, R.E. Geertsma, *Biomaterials* **29**, 1912 (2008)
- J.S. Kim, T.-J. Yoon, K.N. Yu, B.G. Kim, S.J. Park, H.W. Kim, K.H. Lee, S.B. Park, J.-K. Lee, M.H. Cho, *Toxicol. Sci.* **89**, 338 (2006)
- T. Komatsu, M. Tabata, M. Kubo-Irie, T. Shimizu, K.-I. Suzuki, Y. Nihei, K. Takeda, *Toxicol. In Vitro* **22**, 1825 (2008)
- J.-T. Kwon, S.-K. Hwang, H. Jin, D.-S. Kim, A. Minai-Tehrani, H.-J. Yoon, M. Choi, T.-J. Yoon, D.-Y. Han, Y.-W. Kang, B.-I. Yoon, J.-K. Lee, M.-H. Cho, *J. Occup. Health* **50**, 1 (2008)
- Z. Lan, W.-X. Yang, *Nanomedicine (London)* **7**, 579 (2012)
- D.P.K. Lankveld, A.G. Oomen, P. Krystek, A. Neigh, A. Troost-de Jong, C.W. Noorlander, J.C.H. Van Eijkeren, R.E. Geertsma, W.H. De Jong, *Biomaterials* **31**, 8350 (2010)
- C. Li, S. Taneda, K. Taya, G. Watanabe, X. Li, Y. Fujitani, Y. Ito, T. Nakajima, A.K. Suzuki, *Inhal. Toxicol.* **21**, 803 (2009)
- B. Lucas, C. Fields, M.-C. Hofmann, *Birth Defects Res. C Embryo Today* **87**, 35 (2009)
- A. Nemmar, H. Vanbilloen, M.F. Hoylaerts, P.H.M. Hoet, A. Verbruggen, B. Nemery, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **164**, 1665 (2001)
- G. Oberdörster, J. Ferin, B.E. Lehnert, *Environ. Health Perspect.* **102** (Suppl 5), 173 (1994)
- G. Oberdörster, Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, A. Lunts, W. Kreyling, C. Cox, *J. Toxicol. Environ. Health A* **65**, 1531 (2002)
- M.O. Oyewumi, A. Kumar, Z. Cui, *Expert Rev. Vaccines* **9**, 1095 (2010)
- E.-J. Park, E. Bae, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, S.H. Lee, J. Yoon, B.C. Lee, K. Park, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **30**, 162 (2010)
- L.J. Peek, C.R. Middaugh, C. Berkland, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 915 (2008)
- J.R. Peralta-Videa, L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong, J.L. Gardea-Torresdey, *J. Hazard. Mater.* **186**, 1 (2011)
- D.H. Ramdhan, Y. Ito, Y. Yanagiba, N. Yamagishi, Y. Hayashi, C. Li, S. Taneda, A.K. Suzuki, G. Watanabe, K. Taya, M. Kamijima, T. Nakajima, *Toxicol. Lett.* **191**, 103 (2009)
- J.A. Schwartz, A.M. Shetty, R.E. Price, R.J. Stafford, J.C. Wang, R.K. Uthamanthil, K. Pham, R.J. McNichols, C.L. Coleman, J.D. Payne, *Cancer Res.* **69**, 1659 (2009)
- M. Singh, A. Chakrapani, D. O'Hagan, *Expert Rev. Vaccines* **6**, 797 (2007)
- V. Wiwanitkit, A. Sereemasapun, R. Rojanathanes, *Fertil. Steril.* **91**, e7 (2009)
- S. Yoshida, K. Hiyoshi, T. Ichinose, H. Takano, S. Oshio, I. Sugawara, K. Takeda, T. Shibamoto, *Int. J. Androl.* **32**(337) (2009)

## **7.2 BIODISTRIBUTION TESTICULAIRE DE NANOPARTICULES DE SILICE A CŒUR D'OR FLUORESCENTES DE 70 NM APRES INJECTION INTRAMUSCULAIRE CHEZ LA SOURIS.**

Après ce premier travail, nous souhaitons poursuivre nos recherches avec des nanoparticules plus petites, fluorescentes et fabriquées à façon, et d'autre part d'accéder à la microscopie électronique à transmission à haute résolution. Pour répondre à ces objectifs, nous avons pu bénéficier d'une collaboration avec l'Institut Lumière Matière de Lyon.

Ainsi le but de ce travail était d'évaluer la capacité de nanoparticules plus petites (70 nm) à atteindre le testicule. Pour ce faire plusieurs techniques de détection des nanoparticules ont été utilisées : ICP-AES, microscopie électronique à transmission et microscopie confocale. Nous voulions également voir si ces nanoparticules pouvaient franchir la barrière hémato-testiculaire et être à l'origine d'une atteinte histologique du testicule.

Nous avons montré que ces particules injectées par voie intramusculaires ne se distribuaient pas vers le testicule ou alors dans des quantités inférieures au seuil de détection des techniques utilisées à savoir une particule pour  $10^5$  particules injectées. De plus, aucune atteinte histologique du testicule n'a été retrouvée.

# Testicular biodistribution of silica-gold nanoparticles after intramuscular injection in mice

Lara Leclerc<sup>1,2</sup> · Jean-Philippe Klein<sup>1,3</sup> · Valérie Forest<sup>2</sup> · Delphine Boudard<sup>1,3</sup> · Matteo Martini<sup>4</sup> · Jérémie Pourchez<sup>2</sup> · Marie-Geneviève Blanchin<sup>4</sup> · Michèle Cottier<sup>1,3</sup>

© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** With the continuing development of nanomaterials, the assessment of their potential impact on human health, and especially human reproductive toxicity, is a major issue. The testicular biodistribution of nanoparticles remains poorly studied. This study investigated whether gold-silica nanoparticles could be detected in mouse testes after intramuscular injection, with a particular focus on their ability to cross the blood–testis barrier. To that purpose, well-characterized 70-nm gold core–silica shell nanoparticles were used to ensure sensitive detection using high-resolution techniques. Testes were collected at different time points corresponding to spermatogenesis stages in mice. Transmission electron microscopy and confocal microscopy were used for nanoparticle detection, and nanoparticle quantification was performed by atomic emission spectroscopy. All these techniques showed that no particles were able to reach the testes. Results accorded with the normal histological appearance of testes even at 45 days post sacrifice. High-resolution techniques did not detect 70-nm silica-gold nanoparticles in mouse testes after intramuscular injection.

These results are reassuring about the safety of nanoparticles with regard to male human reproduction, especially in the context of nanomedicine.

**Keywords** Nanoparticles · Mice · Testes · Intramuscular injection · Reproductive toxicity

## 1 Introduction

During the last 20 years, nanotechnology has drastically evolved, leading to increasing population-level exposure to engineered nanoparticles and nanomaterials. A wide variety of fields, such as the textile industry, computer sciences, cosmetics, and medicine, have taken advantage of nanostructured compounds. Their intrinsic small size and high surface reactivity (Oberdörster et al. 1994), which could allow specific interactions with biological structures, raise concerns in the scientific community about potential environmental or human health toxicity (Peralta-Videa et al. 2011). Concomitantly, declining sperm counts have been documented in most Western countries (Lackner et al. 2005; Rolland et al. 2013). Thus, concerns have been raised about the ability of nanoparticles to impair human reproduction, especially male fertility (Ema et al. 2010; Lan and Yang 2012). Two types of studies have focused on this topic: (1) testicular biodistribution and biopersistence studies and (2) testicular biotoxicity studies.

With regard to biodistribution, all studies performed in mice or rats have concluded that very limited amounts of nanoparticles can reach the testes regardless of the exposure routes (inhalation, intravenous, oral) and the physico-chemical properties of nanoparticles, including carbon nanotubes and gold, cerium oxide, silica and silver nanoparticles measuring between 10 and 5000 nm (Bai et al. 2010; Balasubramanian et al. 2010; Geraets et al. 2012; De Jong

---

Lara Leclerc and Jean-Philippe Klein contributed equally to this work.

✉ Lara Leclerc  
lara.leclerc@univ-st-etienne.fr

<sup>1</sup> University of Lyon, Jean Monnet University, EA 4624 - LINA, SFR FED 4166 - IFRESIS, 42023 Saint-Etienne, France

<sup>2</sup> Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, EA 4624 - LINA, SFR FED 4166 - IFRESIS, 42023 Saint-Etienne, France

<sup>3</sup> Histology-Embryology Department, University Hospital CHU, Saint-Etienne, France

<sup>4</sup> Institut Lumière Matière, UMR 5306 Université Claude Bernard Lyon1 - CNRS, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France

et al. 2008; Lankveld et al. 2010; Lan and Yang 2012; Morishita et al. 2012; Park et al. 2010; van der Zande et al. 2012). Most studies agree that the testes is a minor target for distribution of nanoparticles compared with other organs (Geraets et al. 2012; De Jong et al. 2008; Lankveld et al. 2010). However, the studies are not entirely consistent. Nanoparticle size variation may explain some of these discrepancies (De Jong et al. 2008; Morishita et al. 2012; Park et al. 2010), and exposure route and particles agglomeration may also contribute to the differences. Testicular biopersistence of nanoparticles seems to depend on exposure route; for instance, biopersistence of silver nanoparticles was less than 2 weeks following intravenous exposure (Lankveld et al. 2010), but more than 4 months after oral exposure (Lee et al. 2013; van der Zande et al. 2012). Furthermore, some authors have suggested that nanoparticles could cross the blood–testis barrier, but only Morishita et al. (2012) have provided evidence. Their study in mice demonstrated the presence of nanoparticles in spermatocytes after an intravenous injection of 70-nm silica nanoparticles.

Regarding testicular biotoxicity, three concerns have been raised: reduction in daily sperm production (Gromadzka-Ostrowska et al. 2012; Xu et al. 2014; Yoshida et al. 2009), although this outcome is not reported by all authors (Bai et al. 2010); increase in testosterone synthesis (Li et al. 2009; Ramdhan et al. 2009; Tassinari et al. 2014; Yoshida et al. 2009); and the appearance of histological abnormalities. Histological analysis of mice testes after multiple intravenous injections of carbon nanotubes showed damage to seminiferous tubules, particularly reductions in the thickness of the germinative layer and the number of germ stem cells; however, the abnormalities resolved after 60 days (Bai et al. 2010). Gromadzka-Ostrowska et al. (2012) showed that intravenous injection of 200-nm silver nanoparticles in rats induced enlargement of intercellular spaces and vacuolization of the germinal epithelium, while 20-nm silver nanoparticles did not have the same effects. In another study, inhalation of carbon black nanoparticles of 14–95 nm in mice led to the degeneration of some seminiferous tubules compared to the control group (Yoshida et al. 2009).

In contrast, Morishita et al. (2012) revealed that although intravenously injected 70 nm silica particles reached the testes, they did not trigger any histological abnormalities in mice. Similarly, Chen et al. (2013) found no testicular histological abnormalities after intraperitoneal injection of pegylated gold nanoparticles in mice, (Chen et al. 2013) and Xu et al. (2014) did not find any histological changes in mice testes after 13 days of intravenous exposure to silica nanoparticles, apart from reversible ultrastructural changes in mitochondria. Finally, no study has found any impact of nanoparticles on testis weight.

In a previous study, we demonstrated the presence of individual 450-nm fluorescent particles in the testes after intramuscular injection in mice (Klein et al. 2013). The intramuscular route was specifically chosen because it is normally used for vaccine delivery, and nanoparticles are increasingly being used and explored as vaccine adjuvants (Gregory et al. 2013; Oyewumi et al. 2010; Peek et al. 2008). However, to our knowledge, no other reports have been published about testicular biodistribution or biotoxicity of nanoparticles used as vaccine adjuvants. Given that some works have shown that smaller nanoparticles induce better immunogenicity (Fifis et al. 2004) and trigger better cellular immune responses (Oyewumi et al. 2010), we studied the testicular biodistribution of smaller particles (70-nm gold core–silica shell nanoparticles) after intramuscular injection in mice. The hybrid nature of these particles allowed (i) an easy detection by high-resolution transmission electron microscopy (TEM) and inductively coupled plasma–atomic emission spectroscopy (ICP-AES) due to the gold core, and (ii) fluorescence detection due to the FITC dyes encased within the silica shell. The histological morphology of testes was also examined to identify any possible morphological alterations in the blood–testis barrier by the presence of particles; the cellular integrity of the seminiferous epithelium was also verified.

## 2 Method

### 2.1 Nanoparticles synthesis and characterization

All colloidal solutions used for biodistribution assays were provided by the ILM laboratory and consisted of 5-nm gold cores coated with a 65-nm polysiloxane shell (SiO<sub>x</sub>) doped with fluorescein molecules. The particle surface was functionalized by the addition of -COOH groups to ensure long-term stability for biological assays. Fluorescein dyes covalently entrapped within a silica matrix were chosen for their strong emission luminescence at 518 nm as tracers for epifluorescence microscopy detection (Olympus). Briefly, the colloidal solution was prepared according to a previous method (Martini et al. 2009) based on sol–gel synthesis in a water/oil microemulsion to control the size, dye amount, and homogeneity of the particle population. Thereafter, particles were purified by ultrafiltration using 300 kDa PES membranes (with a purification rate higher than 10<sup>8</sup>) and then dispersed in aqueous solution (20 g.L<sup>-1</sup>) for further dilutions.

The detailed structural and morphological examination of samples was carried out by transmission electron microscopy (TEM) using a HITACHI H-800 microscope. The samples were prepared by depositing a drop of diluted colloidal solution onto a carbon grid (200 mesh) and allowing the solvent to



evaporate at room temperature. Measurements of the hydrodynamic size and the Zeta-potential were performed on a Dynamic Light Scattering apparatus (Zetasizer NanoZS, Malvern).

## 2.2 Animals

Eighteen male C57BL6 mice (Centre d'Élevage René Janvier, France) were housed at the animal experimental platform of the Jean Monnet University (PLEXAN – Plateforme d'EXpérimentation et ANalyses, Agreement number 42-18-0801) and all experiments were performed in compliance with the French laws and institutional guidelines. An authorization approving the experiments was obtained from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR, field number 00462.02). Experiments were started when the mice were between 6 and 8 weeks of age.

## 2.3 Intramuscular injection of nanoparticles

Particles were diluted in physiological water and a volume of 50  $\mu\text{L}$  was injected in each *tibialis* anterior muscle of 15 mice, for a total amount of  $1.6 \times 10^{13}$  particles per mouse. Three mice received an injection containing only physiological water and constituted the negative control group.

## 2.4 Biological samples

The 15 injected mice were divided into five groups and sacrificed by cervical dislocation after 1 h (H1), 4 days (D4), 21 days (D21), 36 days (D36), or 45 days (D45) post injection. These time points coincide with the duration of spermatogenesis in mice. For each series, testes were excised and prepared for characterization (ICP-AES, histological analysis, TEM, and confocal microscopy); mice from the control group were sacrificed after 45 days. To that purpose testes were obtained and then subdivided in several pieces for the various investigations.

Mice were immobilized and their urine was collected in a tube; blood was collected by retro-orbital puncture just before sacrifice. The silica-gold nanoparticles' structural stability as well as their capacity to translocate from the site of injection were assessed by TEM in whole blood and by ICP-AES in urine samples, respectively.

## 2.5 Induced coupled plasma–atomic emission spectroscopy

At each time point, testes were excised, weighted, mechanically dilacerated, and incubated overnight in a bath of 6 M HCl under agitation. Samples were then dried at 90 °C and diluted in 2 M HCl before ICP analyses of the amount of gold

using adequate controls (ICP-AES, Horiba Jobin Yvon Activa-S coupled with Jobin Yvon AS 421 autosampler).

The same protocol was used to evaluate the levels of gold in urine samples.

## 2.6 Histological analysis

Freshly excised testes were cut and fixed in Japanese fixator (3 % paraformaldehyde, 2 % sodium cacodylate, and 0.2 % picric acid), then rinsed three times (5 min per wash) in sodium cacodylate, and finally dehydrated in two acetone baths (30 min each). Samples were impregnated overnight at 4 °C in glycolmethacrylate (GMA) and then embedded in resin (GMA and aniline/propanol solution) at 4 °C until complete polymerization.

Nonadjacent 3- $\mu\text{m}$ -thick sections of resin-fixed testes were prepared using a microtome (Leica RM 2065). The sections were placed on slides (Superfrost Plus, Thermo Scientific), stained with Masson Trichrome stain, dried, and mounted with an appropriate mounting medium (Eukitt®: Sigma, France). Since the mouse testis is a homogenous organ, we considered each section as representative of the whole testis. Observations were performed with an optical microscope (Nikon Eclipse 80i) coupled with a digital-sight Nikon camera and a series of microscope objectives ( $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 60$ ). The samples were randomly and blindly observed.

## 2.7 Transmission electron microscopy

Freshly excised testes were fixed with a solution of 2 % paraformaldehyde, 4 % glutaraldehyde, 0.2 M monosodium dipotassium buffer at pH 7.4. Testes samples of about 1  $\text{mm}^3$  were then cut and washed five times in 0.175 M monosodium dipotassium buffer and postfixed in 2 % osmium tetroxide. After washing, samples were dehydrated by graded series of ethanol baths (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) with a last bath in a transition solvent (propylene oxide) before embedding in EPON 812 resin. Samples were then sliced using an ultramicrotome (Leica, MTXL).

For conventional TEM studies, 65-nm-thick slices were deposited on Formvar MESH Grid and contrasted by means of uranyl acetate and lead citrate. TEM observations, up to magnification  $\times 150,000$ , were carried out on the samples using a H-800 electron microscope (Hitachi) at 75 kV. Once filtrated and deposited on copper grids, whole blood samples were also analyzed by TEM without the use of contrasting agents.

For elemental gold analysis, slices were deposited onto TEM copper grids covered with carbon film and contrasted only by means of uranyl acetate. High-resolution (HR) TEM studies with electron dispersive X-ray (EDX) analyses were performed using a TOPCON electron microscope capable of a 0.18-nm point to point resolution (EM-002B Ultra High

Resolution Analytical Electron Microscope) operated at 120 kV equipped with EDX detector (Thermo Electron Corporation Noran SI X system). For first step HR imaging some slices were deposited onto TEM copper grids covered with carbon film and contrasted only by means of uranyl acetate. For elemental Au analysis, slices deposited on carbon film grids were prepared without coloration: no uranyl acetate nor lead citrate.

### 2.8 Confocal microscopy

A portion of the samples was placed in a cryopreservative solution (Tissue-Tech®: Sakura, Netherlands) and cryoconserved in liquid nitrogen. For confocal analyses, 10- $\mu$ m slides were cut with a cryostat at  $-20$  °C (Leica CM-3000). Sections were then dried, mounted with an appropriate mounting medium (Fluoromount®: Argene, France), and stored at  $4$  °C in the dark.

Analyses were performed using a confocal microscope TCS-SP2 (Leica® Microsystems, Heidelberg, Germany) coupled to an inverted microscope with oil immersion objective (HCX APO L U-V-I 63 9 1.2 NA), and fitted with acousto-optical beam splitter covering a 350–850 nm wavelength range.

## 3 Results

### 3.1 Nanoparticles characterization

Physico-chemical features of the nanoparticles are reported in Fig. 1. The monoexponential correlation function obtained allows us to determine the Z-average, polydispersity index, and zeta potential values before the application. The size distribution of nanoparticles (Fig. 1a) assessed by dynamic light scattering showed an average diameter of 70 nm with negligible variation. The good homogeneity of the particle size as well as the absence of particle agglomeration allowed the use of colloidal solutions for biodistribution assays. As expected, the zeta potential at physiological pH (Fig. 1b) was negative and equal to  $-13$  mV, due to the covalently grafted carboxylate surface groups. On TEM images (Fig. 1c) the gold core was highlighted by dark-contrast spot at the center of the particle, this picture also illustrates the good reproducibility of the nanoparticle synthesis. The fluorescent signal of the particles was validated using epi-fluorescent microscopy (Fig. 1d).

The presence of silica-gold nanoparticles in whole blood samples was assessed by TEM and in urine samples by ICP-AES, as shown in Fig. 2. A significant amount of gold was detected in urine at H1 and D4 (Fig. 2a) and nanoparticles were observed in blood samples at D4 and D21 (Fig. 2b), indicating that nanoparticles were able to leave the site of

injection and maintain their integrity over time in biological media.

### 3.2 ICP quantification

The presence of gold was quantified in the testes using the ICP-AES technique. A dilution series of nanoparticles was performed to assess the detection limit of the technique (1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/10,000, 1/100,000). These preliminary data showed that under a 1/100,000 dilution the ICP technique was not able to detect gold in the samples, defining a threshold of  $1.6 \times 10^8$  nanoparticles (data not shown).

Figure 3 summarizes the estimated amount of gold in the testes (expressed in ppm) normalized by the organ weight. A positive control corresponding to the same amount of nanoparticles injected directly into a freshly excised testis was used. Regardless of the time of analysis after exposure, gold amounts were very weak, indicating a negligible testicular presence of the nanoparticles after intramuscular injection. A calibration curve revealed that less than 1 out of  $10^5$  nanoparticles reached the testis.

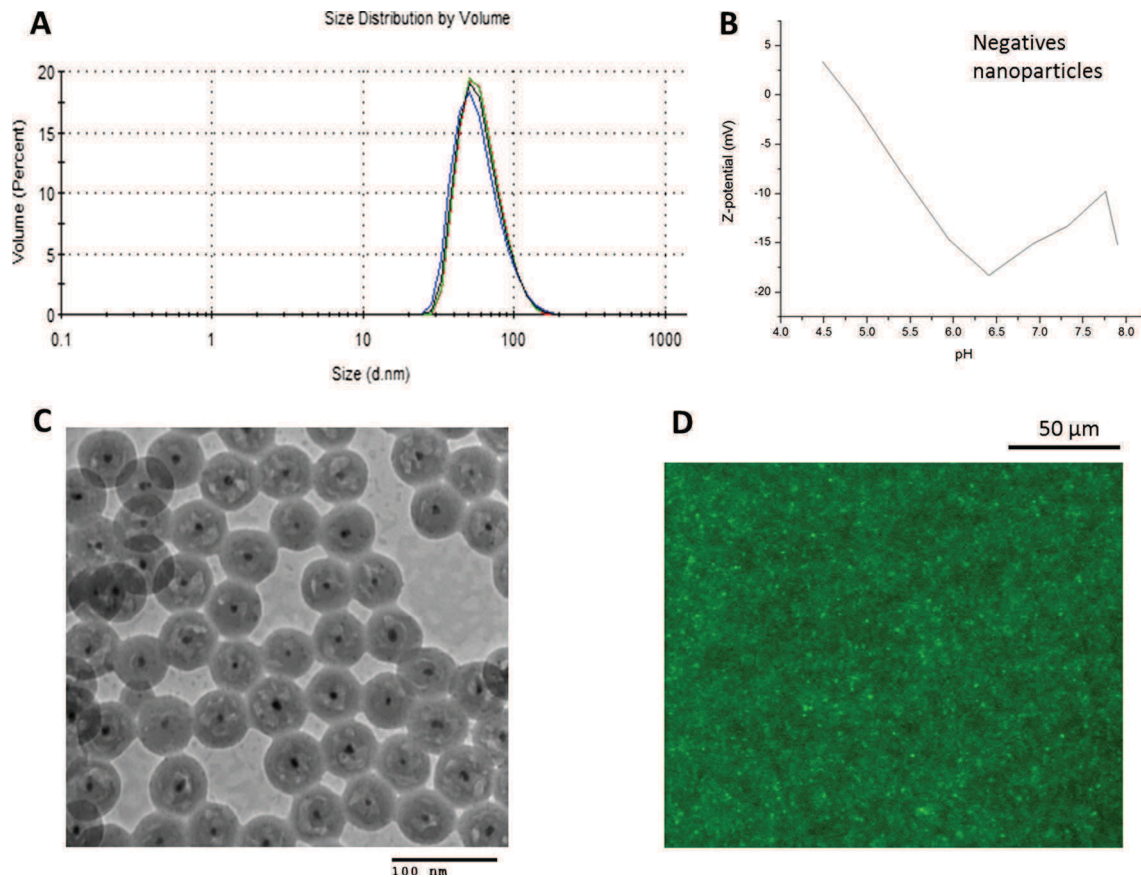
### 3.3 Histological observations

After Masson Trichrome staining, tissue sections from control mice and mice injected with the nanoparticles were compared to investigate potential histological alterations (Fig. 4). Regardless of the time of analysis, the testis generally appeared well preserved, without morphological alterations. Even after 45 days of exposure, no tubule necrosis or histological disorganization at the level of germinal cells and spermatozooids were observed, either in the intertubular spaces with blood vessels or in the Leydig cells. Moreover, the Sertoli cells, which form the blood–testis barrier that might be able to internalize nanoparticles, appeared morphologically normal and abundant. The proportion of each cell type seemed normal at each time of exposure (Fig. 4a and b).

Only small alterations of tubules were occasionally observed on the slides, irrespective of the time of analysis. Similar alterations were also seen on the control slides, indicating no correlation with the nanoparticle exposure (Fig. 4c–e). Some giant germinal cells with large vacuolized cytoplasm as well as desquamation of the germinal cells in the lumen of tubules were observed.

A particular alteration was noticed on one mouse at D4, with empty tubules showing only Sertoli cells without germinal cells (Fig. 4f). Although this type of alteration is compatible with a toxic event, in this case it was considered to be an artifact because it was observed very soon after exposure and was observed only for a single mouse.





**Fig. 1** Physico-chemical characteristics of the nanoparticles injected into mice. **a** Size distribution obtained by dynamic light scattering. **b** Zeta potential (isoelectric pH). **c** Transmission electron microscopy. Note the

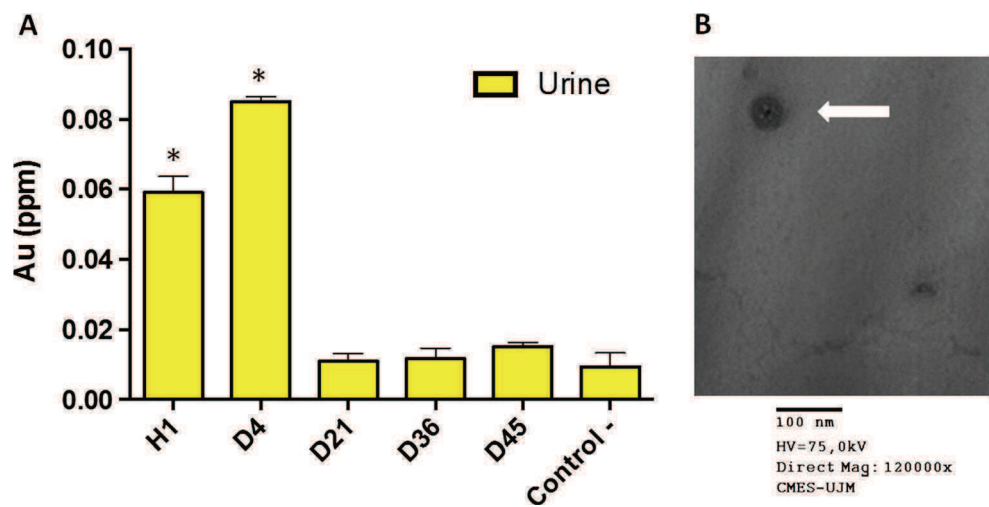
reproducibility of the 5-nm gold core. **d** FITC fluorescence of the nanoparticles detected by epi-fluorescence microscopy

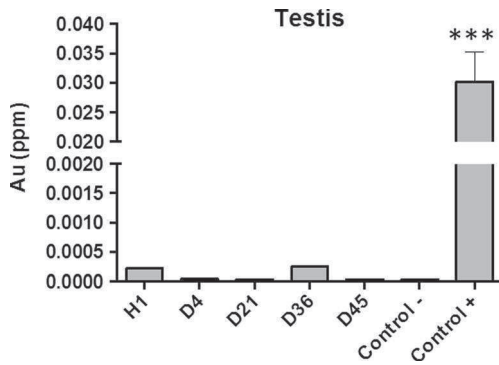
### 3.4 TEM studies

TEM observations can give information about the inner morphology of testes as well as the spatial distribution of nanoparticles present in the tissues. Analyses were performed on the testes with a multiscale approach to detect whether nanoparticles were present. The mouse testis is a homogenous

organ, with repetitions of the morpho-functional unit corresponding to the seminiferous tubule surrounded by the intertubular spaces, which contain the Leydig cells. Thus, it was assumed that each sliced section was representative of the whole testis. To visualize all the structures at each time point, 40 slices per sample were observed. This reduced any systematic error due to the specific choice of a few slices.

**Fig. 2** Assessment of nanoparticles detection, morphological stability and ability to reach blood circulation after injection. **a** Quantification of gold in urine by means of ICP-AES. Results are expressed in parts per million (ppm). **b** Representative images of blood samples observed by TEM after filtration. *White arrow* shows a nanoparticle at D21

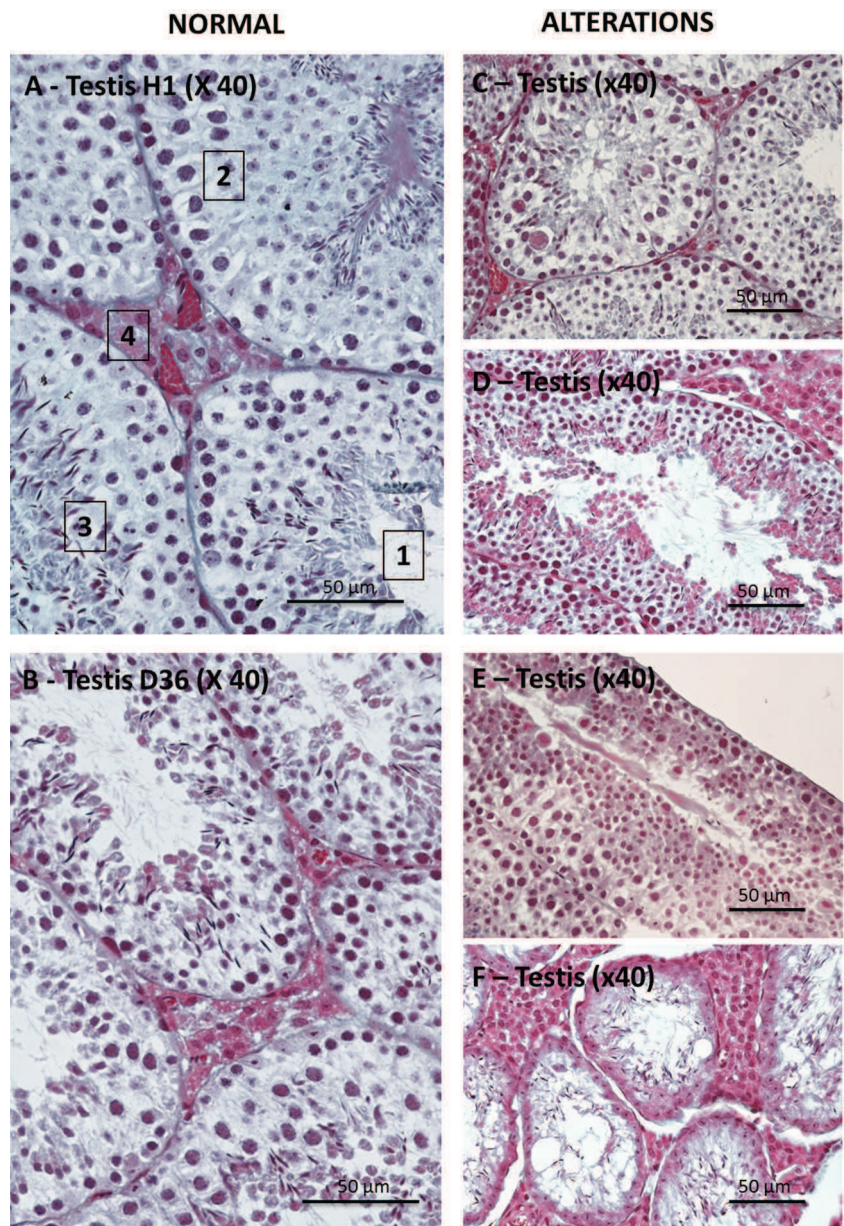




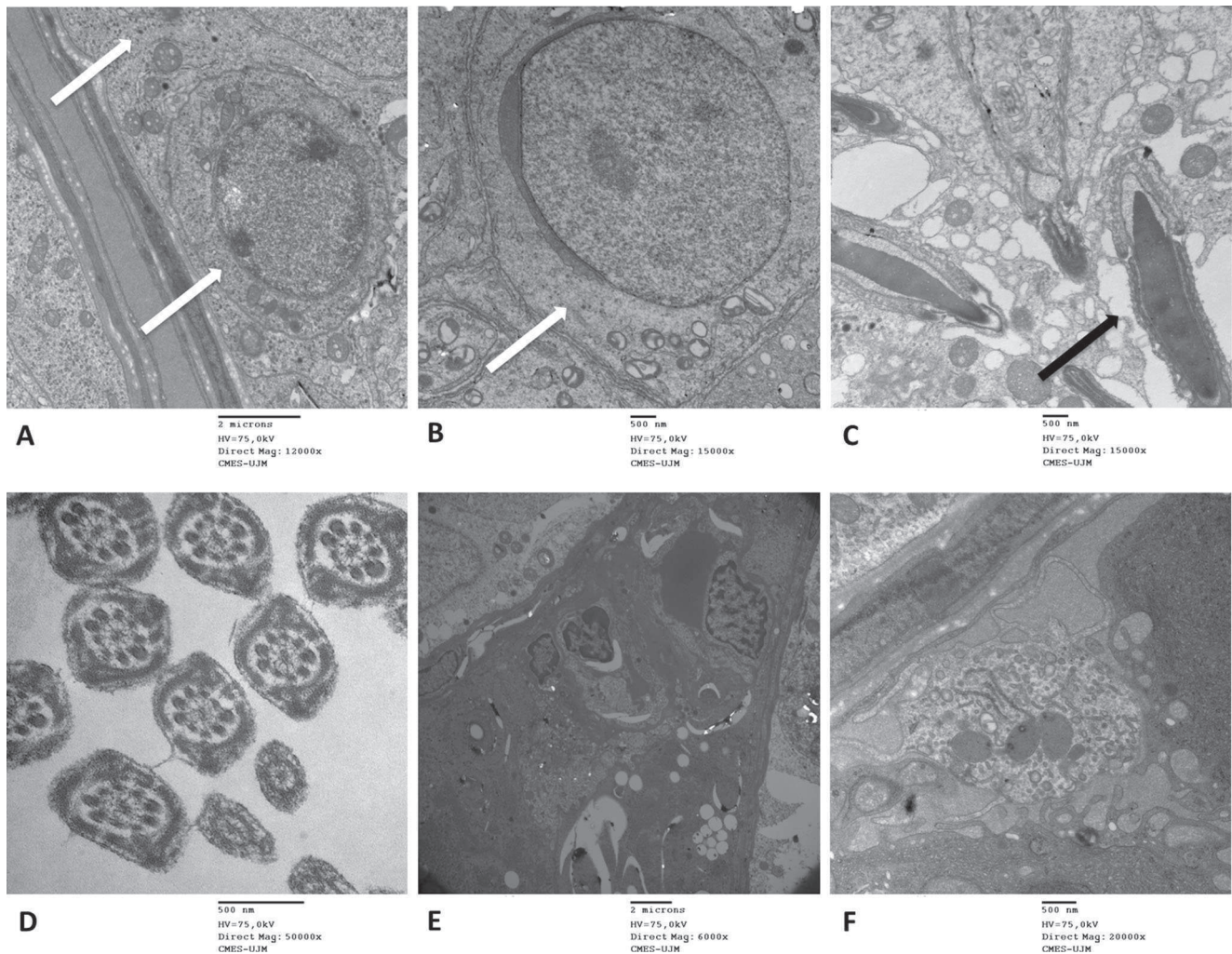
**Fig. 3** ICP quantification of gold in the testes. Results are expressed in parts per million (ppm). Values are extremely low in each case and the data are not significantly different from the negative control (one-way ANOVA with Bonferroni comparison test, \*\*\* $p < 0.001$ , Graphpad Prism 6)

First, conventional (Hitachi microscope) TEM observations (Fig. 5) were performed for the detection of nanoparticles in the samples. All slices were carefully imaged and entirely inspected. Cellular structures such as cytoplasmic vacuoles in Sertoli and germinal cells and the intertubular spaces containing the Leydig cells were studied to find nanoparticles. Particular care was taken in examining the seminiferous tubules (two to three tubules sections contained in each slice) to determine if nanoparticles can cross the blood–testis barrier. For each time point of the spermatogenesis process, no nanoparticles were identified in any of the regions of interest. One fourth of the sections were selected for HR imaging coupled with EDX analysis using the TOPCON microscope (Fig. 6). No contrast

**Fig. 4** Representative images of histological slides of testis. The left part of the figure shows images of H1 (a) and D36 (b) with normal morphological figures (equivalent to the control condition): (1) seminiferous tubule in cross-section (large tubular structure), (2) different types of germinal cells, (3) sperm (black, tiny, ovoid bodies), (4) tubular spaces with blood vessels and Leydig cells. The right part of the figure illustrates the different histological alterations observed. **c** Giant germinal cells with a large vacuolized cytoplasm, **d** desquamated germinal cells in the tubular lumen, **e** both, **f** empty tubule with only Sertoli cells







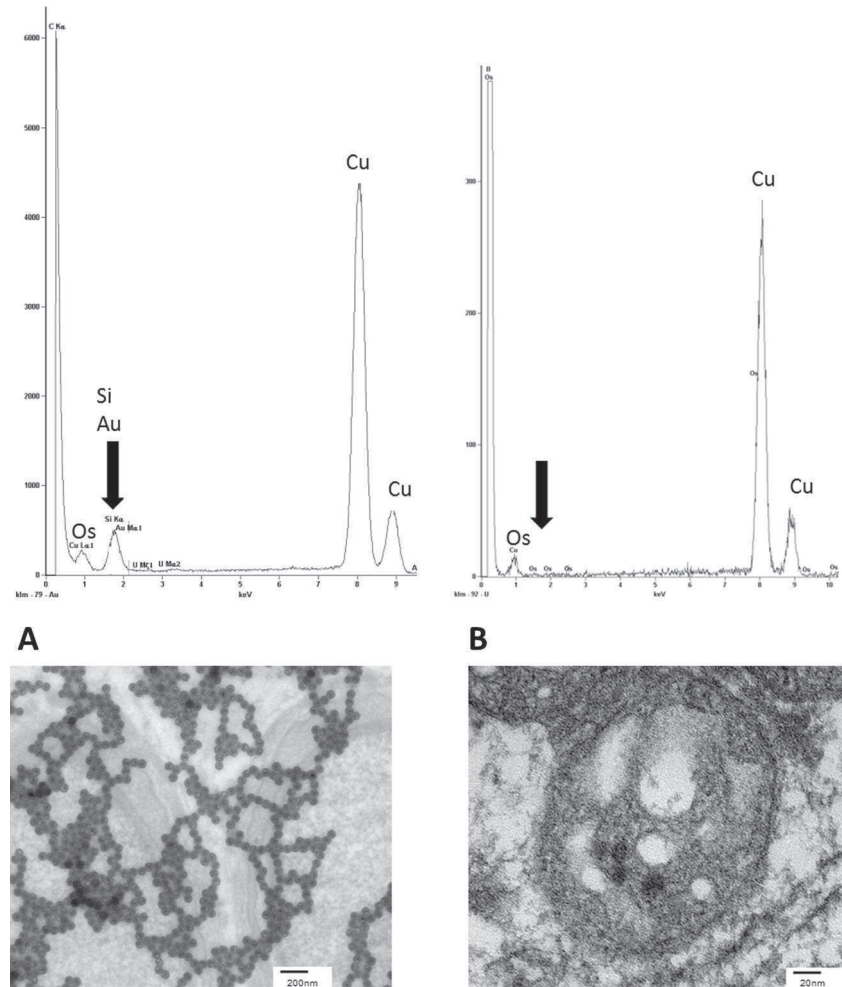
**Fig. 5** Representative images of testis samples observed by TEM (H1, D4, D21, D36, and D45). **a** Germinal spermatogonia cell contiguous to the basement membrane of the seminiferous tubules (*lower white arrow*) and Sertoli cell forming the blood–testis barrier (*upper white arrow*). **b**

Spermatocyte (*white arrow*). **c** Mature spermatozooids (*black arrow*). **d** Flagellum cross sections. **e**, **f** Intertubular spaces with Leydig cells, immune cells and vessels. No nanoparticles were detected in the H1, D4, D21, D36, and D45 samples

metallization of the slices was performed to suppress the background noise from lead and uranyl compounds, and consequently the signal of the copper grid was detected on the spectra. Reference data were recorded from a control sample (Fig. 6a) obtained from a section slice covered by a drop of the silica-gold nanoparticle suspension. An area imaged in Fig. 6a displays the characteristic features of the silica-gold nanoparticles, and the EDX spectrum recorded on the corresponding slice region exhibits a well-marked peak resulting from the contributions of the silicon and gold elements in addition to the peaks from copper and osmium. The results from the D45 samples reproduced in Fig. 6b are representative of those for all other time points. Again the slices were carefully inspected by high resolution/high magnification imaging (Fig. 6b) and no indication of the nanoparticles (morphology, size, contrast) could be identified on the images. The corresponding

EDX spectra showed only a weak peak, corresponding to the osmium post-fixing agent included in the samples during the preparation, but no silicon-gold peak. Similar spectra were observed for series of samples, revealing the absence of the silicon-gold signal. The problem of the Minimum Detectable Mass (MDM) of a given element in a given matrix has been investigated both theoretically and experimentally (Reimer et al. 1989; Williams 1984). For the TEM / EDX system used here and operated in the conditions of the present studies the MDM of a heavy element like Au in a biological thin foil (light elements with a very small concentration of osmium) should be a few  $10^{-19}$  g, whereas the mass of one 5 nm gold core is more than  $10^{-18}$  g. Thus the cross correlation of HR imaging inspection with corresponding EDX analysis supports the conclusion that there is no gold core nanoparticle in the observed sections.

**Fig. 6** HR imaging studies coupled with EDX analysis in the TOPCON electron microscope for different specimens of interest. The upper part of the figure displays the EDX spectra and the lower part shows the corresponding images of the analyzed regions. **a** Control specimen corresponding to a drop of silica-gold nanoparticle suspension deposited on a sample slice. **b** Image and spectrum from a D45 sample (representative of all the samples)



### 3.5 Confocal observations

To optimize fluorescein emission detection, reflection imaging was used to visualize testes, avoiding tissue autofluorescence as demonstrated in our previous study (Klein et al. 2013). For all samples, five slices were screened for each time point without being able to distinguish any fluorescent nanoparticles (Fig. 7a–f). Cellular structures appeared fluorescent on the samples, even on the negative control within the intertubular spaces. These areas corresponded to red blood cells, which are known to be autofluorescent.

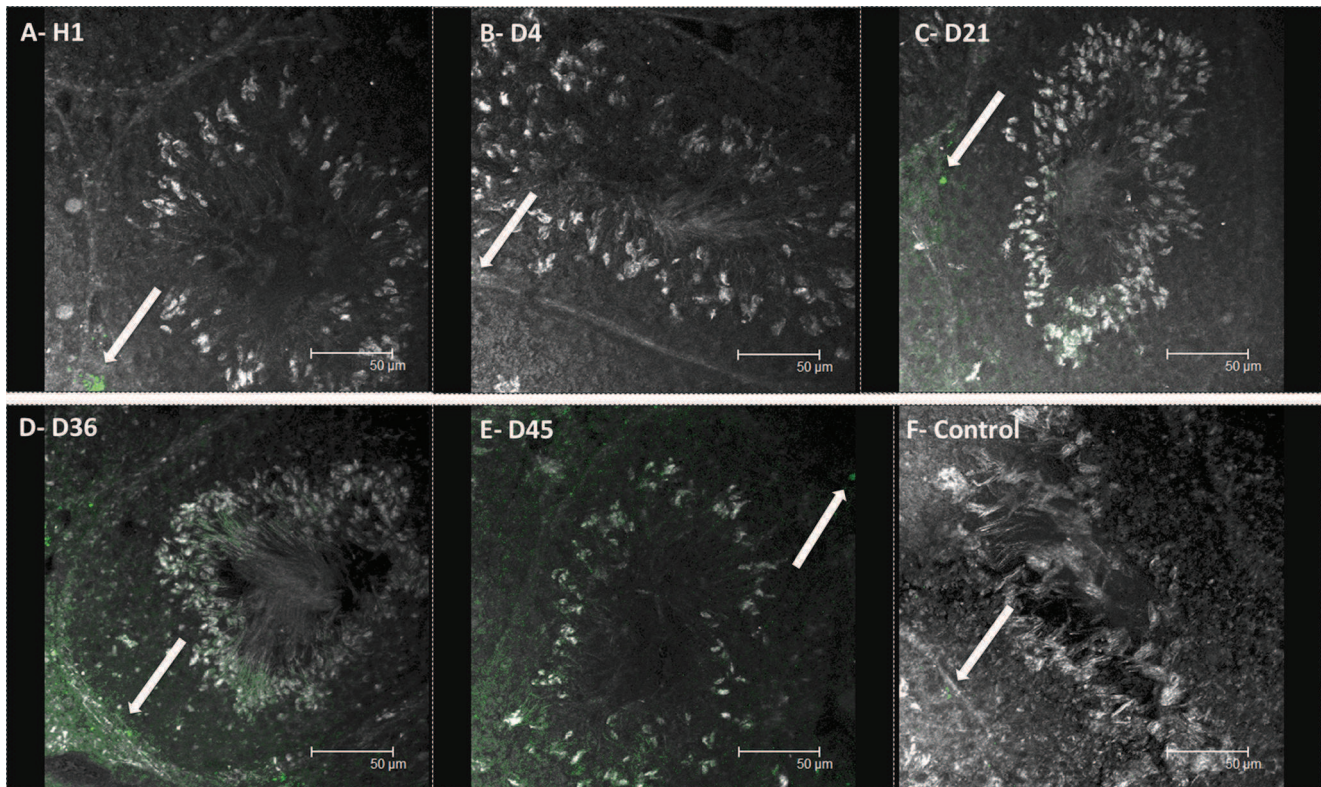
## 4 Discussion

The aim of this study was to assess the testicular biodistribution of 70-nm gold-silica nanoparticles after intramuscular injection in mice and to define their histological reproductive toxicity. As previously mentioned, the use of nanoparticles as a vaccine adjuvant is promising due to their ability to enhance immune response. However, safety has been poorly documented, especially considering the

intramuscular exposure route. This study was intended to address this issue. The nanoparticles were designed to be detectable by several complementary methodologies (epi-fluorescence and confocal microscopy, ICP-AES, electron microscopy). All of the physico-chemical properties as well as the morphology and stability of tracers were validated before the nanoparticles were injected into mice. The ability of nanoparticles to enter the circulatory system and their stability in the blood were assessed by observing them in blood samples at D4 and D21 using TEM. It was also shown that significant amounts of particles were excreted through urine at H1 and D4.

Here an original multiscale approach using high-resolution methodologies (confocal microscopy, ICP-AES, TEM, and EDX) was achieved. Regarding qualitative techniques, especially confocal microscopy, though testicular autofluorescence remained a problem despite the use of reflection imaging, the present image features do not seem indicative of the presence of nanoparticles. Testicular autofluorescence is mainly in the visible spectrum, so we are currently developing Cyanine 5.5-doped nanoparticles of the same size (70 nm): their emission is centered in the near infrared region, which





**Fig. 7** Confocal microscopy observations at the different times of sacrifice (a to h respectively: H1, D4, D21, D36, D45 and the control). The testes were imaged by reflection (*gray level*). The green fluorescence

observed is not specific of the nanoparticles but instead corresponds to red blood cells (*white arrow*)

will help us to reduce background noise and obtain more reliable results using confocal microscopy. ICP-AES detection threshold for the nanoparticles used in this study was estimated to be  $1.6 \times 10^8$  nanoparticles, which corresponded to 1/100,000 of the injected dose. The use of other measurement techniques such as ICP-MS could improve the sensitivity of nanoparticles detection by reducing this threshold. Despite the limitations of confocal microscopy and ICP-AES techniques their correlation with the conclusive results of present imaging and analysis TEM studies supported the conclusion that nanoparticles were absent in the testes.

Previous biodistribution studies showed that small amounts of sub-micrometric particles reached the testes, depending on experimental conditions. For example, after a single intravenous injection of 5 mg/kg of carbon nanotubes in mice, 151 ng of particles were found in testes 24 h later, corresponding to about 0.1 % of the injected particles (Bai et al. 2010). Lankveld et al. (2010) found comparable results after intravenous injection of 20-nm silver nanoparticles for 5 days. Testicular distribution of 80-nm and 110-nm particles was also observed in very low amounts. De Jong et al. (2008) reported that after intravenous injection of 80 μg of 10-nm gold nanoparticles in rats, 55 ng/g was found in the testes, which means 1 out of 100,000 particles. Balasubramanian et al. (2010) observed similar results with a small amount of 20-nm gold

nanoparticles (3 μg per rats) injected intravenously. Lee et al. (2013) also showed that about one 10- or 25-nm silver nanoparticle out of  $10^6$  was able to reach the rat testis after 4 weeks of oral exposure. Our previous results showed that 1 out of  $10^7$  450-nm particles injected by the intramuscular route was found in the testes (Klein et al. 2013). In the present study, using smaller particles (70 nm), it was observed that less than 1 out of  $10^5$  nanoparticles was able to reach the testes after intramuscular injection. This result seems in agreement with other quantitative studies about particles larger than 50 nm injected by intravenous route, which tend to be either not distributed in testes or distributed in very small amounts (Morishita et al. 2012). Similarly, De Jong et al. (2008) also demonstrated that 50-, 100-, and 250-nm particles were unable to reach testes (De Jong et al. 2008). Therefore, despite different exposure routes, the results tend to support the same conclusion, suggesting that nanoparticle size could be a key point for differences in testicular biodistribution.

In this study, we also confirmed that no morphological alterations of the testes were apparent as a result of exposure to nanoparticles. This result is in accordance with Morishita et al. (2012) and Chen et al. (2013).

To put the low testicular distribution of nanoparticles observed in this study into perspective with the risk of reproductive toxicity of nanoparticles in real-life situations, *in vitro*

studies are useful. Indeed, these investigations are complementary to *in vivo* models and provide additional information. The use of cell lines is particularly appropriate for the investigation of the mechanisms or thresholds of toxicity. Asare et al. (2012) showed that after murine testicular cells underwent a 48-h exposure to 10 µg/ml of silver nanoparticles, the metabolic activity measured by MTT assay was reduced and the number of necrotic cells was slightly increased; however, other toxic effects, such as apoptosis and DNA damage, were only observed for higher concentrations (Asare et al. 2012). It was also shown that carbon black nanoparticles at a concentration of 10 µg/ml were able to increase StAR expression in Leydig cells, which could cause an increase in testosterone synthesis. Smaller concentrations of TiO<sub>2</sub>, carbon black, or diesel exhaust particles had no impact on Leydig cells (Komatsu et al. 2008), whereas Braydich-Stolle et al. (2005) showed that silver (Ag, 15 nm), molybdenum (MoO<sub>3</sub>, 30 nm), and aluminum (Al, 30 nm) nanoparticles at a concentration of 5 µg/ml increased leakage of lactate dehydrogenase from germ-line stem cells (Braydich-Stolle et al. 2005). Taken together, these data suggest that studies using different kinds of nanoparticles, different cells types, and so forth yield varying results, making it difficult to draw definitive conclusions. However, a clear trend is emerging: in most of the published papers, toxic effects were observed only for high concentrations of particles (above 5 µg/ml). Thus, considering that our results showed that less than 1 out of 10<sup>5</sup> particle reached the testis after an intramuscular injection, this route can be considered as safe as long as the quantity of nanoparticles injected into mice does not exceed 50 mg. This value appears too high to be clinically relevant or even realistic. Therefore, we may extrapolate that the probability of toxicity on the reproductive system is very low.

## 5 Conclusions

Negatively charged 70-nm silica nanoparticles were injected intramuscular to study the biodistribution and effects of colloidal solution on testes. Different physico-chemical detection techniques confirmed the absence of nanoparticles in this region of interest. Moreover, no histological toxicity signs were observed. This study is reassuring regarding reproductive toxicity concerns associated with the possible use of nanoparticles in intramuscular injections, especially as vaccine adjuvants. Further in-depth analyses with different exposure routes and various nanoparticle chemistries (e.g., varying size, surface, composition) should be performed to confirm the reproductive safety of nanoparticles.

**Acknowledgments** The authors would like to acknowledge the financial support of the French Rhône Alpes Region through the *ARC3*

*Environnement* Research Program. They are grateful to Dr N. Blanchard for his help in operating the TOPCON microscope at ILM Institute.

**Authors' contributions** LL, JPK, MGB and MC contributed to the conception and the design of research.

LL, JPK, VF, DB, MM and MGB materially participated in the research experiments analysis and interpretation of data.

LL and JPK were involved with drafting article.

JP and all authors were involved with reviewing the article.

All authors have approved the final version of this article.

**Compliance with ethical standards** All experiments were performed in compliance with the French laws and institutional guidelines. An authorization approving the experiments was obtained from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR, field number 00462.02).

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- N. Asare, C. Instanes, W.J. Sandberg, M. Refsnes, P. Schwarze, M. Kruszewski, G. Brunborg, *Toxicology* **291**, 65 (2012)
- Y. Bai, Y. Zhang, J. Zhang, Q. Mu, W. Zhang, E.R. Butch, S.E. Snyder, B. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **5**, 683 (2010)
- S.K. Balasubramanian, J. Jittiwat, J. Manikandan, C.-N. Ong, L.E. Yu, W.-Y. Ong, *Biomaterials* **31**, 2034 (2010)
- L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J.J. Schlager, M.-C. Hofmann, *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **88**, 412 (2005)
- J. Chen, H. Wang, W. Long, X. Shen, D. Wu, S.-S. Song, Y.-M. Sun, P.-X. Liu, S. Fan, F. Fan, X.-D. Zhang, *Int. J. Nanomedicine* **8**, 2409 (2013)
- W.H. De Jong, W.I. Hagens, P. Krystek, M.C. Burger, A.J.A.M. Sips, R.E. Geertsma, *Biomaterials* **29**, 1912 (2008)
- M. Ema, N. Kobayashi, M. Naya, S. Hanai, J. Nakanishi, *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **30**, 343 (2010)
- T. Fifis, A. Gamvrellis, B. Crimeen-Irwin, G.A. Pietersz, J. Li, P.L. Mottram, I.F.C. McKenzie, M. Plebanski, *J. Immunol.* **173**, 3148 (2004)
- L. Geraets, A.G. Oomen, J.D. Schroeter, V.A. Coleman, F.R. Cassee, *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **127**, 463 (2012)
- A.E. Gregory, R. Titball, D. Williamson, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 13 (2013)
- J. Gromadzka-Ostrowska, K. Dziendzikowska, A. Lankoff, M. Dobrzyńska, C. Instanes, G. Brunborg, A. Gajowik, J. Radzikowska, M. Wojewódzka, M. Kruszewski, *Toxicol. Lett.* **214**, 251 (2012)
- J.-P. Klein, D. Boudard, J. Cadusseau, S. Palle, V. Forest, J. Pourchez, M. Cottier, *Biomed. Microdevices* **15**, 427 (2013)
- T. Komatsu, M. Tabata, M. Kubo-Irie, T. Shimizu, K.-I. Suzuki, Y. Nihei, K. Takeda, *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **22**, 1825 (2008)
- J. Lackner, G. Schatzl, T. Waldhör, K. Resch, C. Kratzik, M. Marberger, *Fertil. Steril.* **84**, 1657 (2005)
- Z. Lan, W.-X. Yang, *NanoMed.* **7**, 579 (2012)
- D.P.K. Lankveld, A.G. Oomen, P. Krystek, A. Neigh, A. Troost-de Jong, C.W. Noorlander, J.C.H. Van Eijkeren, R.E. Geertsma, W.H. De Jong, *Biomaterials* **31**, 8350 (2010)
- J.H. Lee, Y.S. Kim, K.S. Song, H.R. Ryu, J.H. Sung, J.D. Park, H.M. Park, N.W. Song, B.S. Shin, D. Marshak, K. Ahn, J.E. Lee, I.J. Yu, *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 36 (2013)

- C. Li, S. Taneda, K. Taya, G. Watanabe, X. Li, Y. Fujitani, Y. Ito, T. Nakajima, A.K. Suzuki, *Inhal. Toxicol.* **21**, 803 (2009)
- M. Martini, P. Perriat, M. Montagna, R. Pansu, C. Julien, O. Tillement, S. Roux, *J. Phys. Chem. C* **113**, 17669 (2009)
- Y. Morishita, Y. Yoshioka, H. Satoh, N. Nojiri, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, S. Tsunoda, H. Nabeshi, T. Yoshikawa, Y. Tsutsumi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **420**, 297 (2012)
- G. Oberdörster, J. Ferin, B.E. Lehnert, *Environ. Health Perspect.* **102**(5), 173 (1994)
- M.O. Oyewumi, A. Kumar, Z. Cui, *Expert Rev. Vaccines* **9**, 1095 (2010)
- E.-J. Park, E. Bae, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, S.H. Lee, J. Yoon, B.C. Lee, K. Park, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **30**, 162 (2010)
- L.J. Peek, C.R. Middaugh, C. Berkland, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 915 (2008)
- J.R. Peralta-Videa, L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong, J.L. Gardea-Torresdey, *J. Hazard. Mater.* **186**, 1 (2011)
- D.H. Ramdhan, Y. Ito, Y. Yanagiba, N. Yamagishi, Y. Hayashi, C. Li, S. Taneda, A.K. Suzuki, G. Watanabe, K. Taya, M. Kamijima, T. Nakajima, *Toxicol. Lett.* **191**, 103 (2009)
- L. Reimer, *Transmission Electron Microscopy, Second Edition* (Springer-Verlag, 1989)
- M. Rolland, J. Le Moal, V. Wagner, D. Royère, J. De Mouzon, *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **28**, 462 (2013)
- R. Tassinari, F. Cubadda, G. Moracci, F. Aureli, M. D'Amato, M. Valeri, B. De Berardis, A. Raggi, A. Mantovani, D. Passeri, M. Rossi, F. Maranghi, *Nanotoxicology* **8**, 654 (2014)
- M. van der Zande, R.J. Vandebriel, E. Van Doren, E. Kramer, Z. Herrera Rivera, C.S. Serrano-Rojero, E.R. Gremmer, J. Mast, R.J.B. Peters, P.C.H. Hollman, P.J.M. Hendriksen, H.J.P. Marvin, A.A.C.M. Peijnenburg, H. Bouwmeester, *ACS Nano* **6**, 7427 (2012)
- D. B. Williams, *Practical Analytical Electron Microscopy in Materials Science* (Philips Electronic Instruments, 1984)
- Y. Xu, N. Wang, Y. Yu, Y. Li, Y.-B. Li, Y.-B. Yu, X.-Q. Zhou, Z.-W. Sun, *PLoS ONE* **9**, e101572 (2014)
- S. Yoshida, K. Hiyoshi, T. Ichinose, H. Takano, S. Oshio, I. Sugawara, K. Takeda, T. Shibamoto, *Int. J. Androl.* **32**, 337 (2009)





## 8 ETUDES CLINIQUES

Alors que l'étude de la biodistribution des particules et des éléments ne peut pas réellement s'envisager chez l'homme, l'étude de leur biotoxicité est en revanche tout à fait réalisable au travers d'études épidémiologiques. Au CHU de Saint-Etienne, nous disposons d'un recrutement important de patients consultants pour des troubles de la fertilité, nous avons donc pu proposer à ces patients d'être inclus au sein de deux études cliniques visant d'une part à quantifier la présence de nanoparticules, pour la première, ou d'aluminium, pour la seconde dans le sperme des patients inclus et d'autre part à rechercher un lien entre la présence de ces matériaux et les caractéristiques spermatiques des patients.

Pour ces deux études, nous avons évalué les caractéristiques spermatiques des patients à l'aide d'un spermogramme réalisé au sein du service d'histologie-embryologie du CHU de Saint-Etienne. Nous avons également défini l'exposition des patients à l'aluminium ou aux nanoparticules en réalisant un dosage du matériau considéré dans le sperme des patients inclus.

### 8.1 MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DETECTION DES NANOPARTICULES

#### DANS LE SPERME HUMAIN

L'objectif initial de ce travail était de profiter du caractère pluridisciplinaire de notre équipe pour mettre au point une technique efficace et fiable de détection des nanoparticules dans le sperme humain. Nous avons pour ce faire trois outils à notre disposition : la DLS, l'ICP AES et la microscopie électronique à balayage. L'ICP-AES permettant uniquement la détection des éléments, l'aspect particulaire devait être fourni par les deux autres techniques. Toutefois la richesse des échantillons en matériel biologique s'est rapidement révélée être une difficulté importante.

Ainsi le signal d'un plasma séminal en DLS est très important, autour de 350 000 kcps ce qui équivaut à environ 1 g/L de nanoparticules modèles de 50 nm avec des objets biologiques présentant une taille autour de 200 nm (Figure 34).

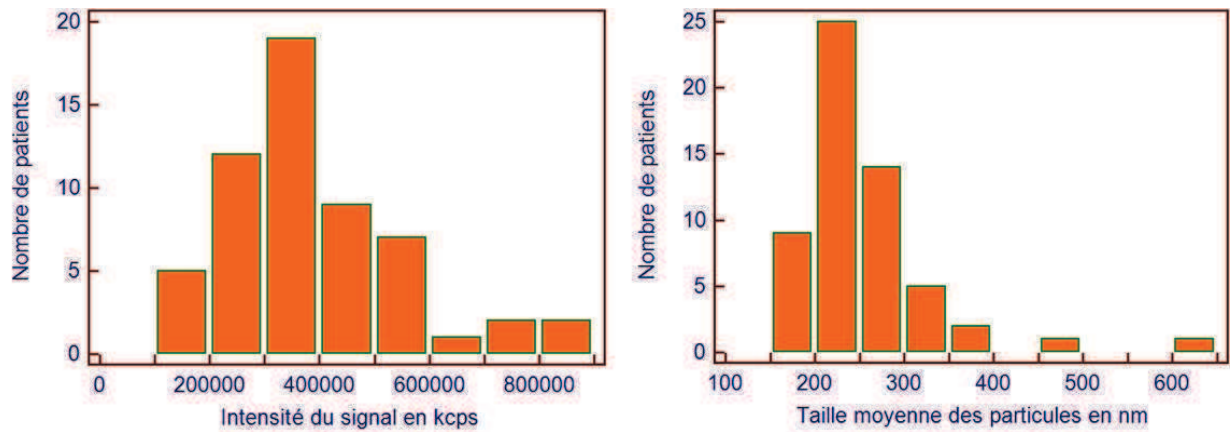


FIGURE 34 : SIGNAL RECUEILLI LORS DU PASSAGE DE 57 SPERMES DE PATIENTS EN DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE. L'INTENSITE DU SIGNAL BIOLOGIQUE S'AVERE PARTICULIEREMENT ELEVEE. KCPS : KILOCOUPS PAR SECONDE.

De même en microscopie électronique à balayage, la présence d'éléments biologiques (protéines du plasma, spermatozoïdes) crée un film qui empêche la détection des nanoparticules (Figure 35).

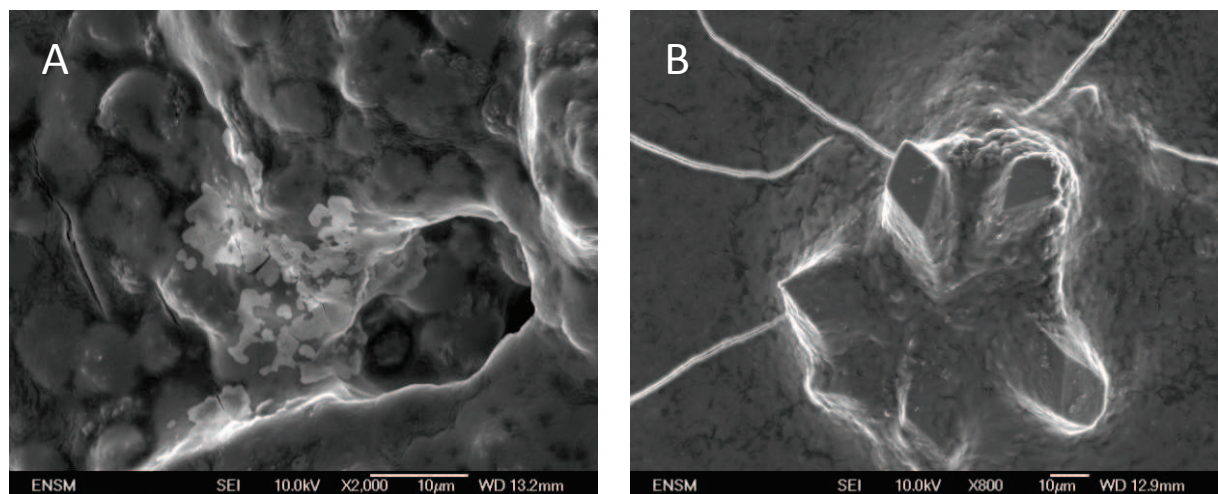


FIGURE 35 : IMAGES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE D'UN PLASMA SEMINAL, LA DETECTION DE PARTICULES DANS UN ENVIRONNEMENT AUSSI RICHE EN MATERIEL BIOLOGIQUE EST PRESQUE IMPOSSIBLE. A : ILLUSTRATION DE LA TRAME DE FOND DES ECHANTILLONS, X 2000. B : IMAGE D'UN CRISTAL SUR TRAME DE FOND FISSUREE, X 800.

Nous avons donc tenté de mettre au point un protocole permettant de limiter le bruit de fond lié à la présence de matériel biologique et d'analyser des nanoparticules présentes dans le sperme.

### 8.1.1 EXTRACTION DES NANOPARTICULES ET ANALYSE EN DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE.

Dans le but de se débarrasser du bruit de fond biologique, notre première idée a été d'extraire les nanoparticules du sperme pour pouvoir ensuite les analyser en DLS afin de mesurer la quantité et la taille des nanoparticules présentes dans l'échantillon.

### 8.1.1.1 NANOPARTICULES MODELES

Pour mettre au point cette technique nous avons travaillé à partir de quatre nanoparticules industrielles modèles dont l'étude de la toxicité a été recommandée par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE)<sup>165</sup>. Les particules étudiées étaient les suivantes : oxyde d'aluminium, oxyde de titane, oxyde de zinc et oxyde de fer. Chacune des particules a été caractérisée en DLS et en microscopie électronique à balayage, ces caractéristiques sont résumées dans la Figure 36. On notera que la taille des particules d'aluminium (autour de 200 nm de diamètre) est nettement supérieure aux autres (autour de 80 nm de diamètre). En outre, les particules d'aluminium ont une tendance spontanée à s'agglomérer, ce qui n'est pas le cas des autres particules.

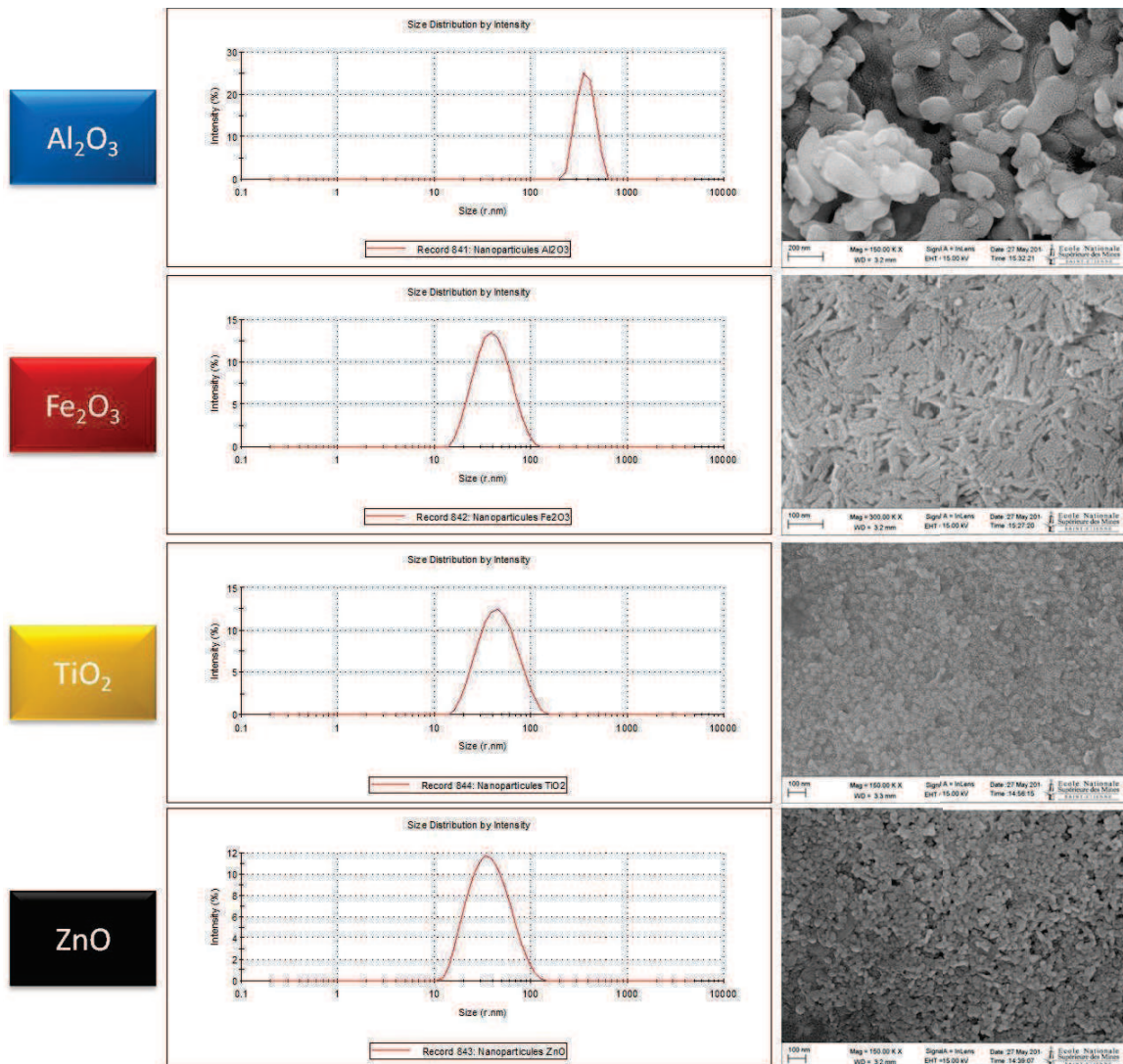


FIGURE 36 : CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES NANOPARTICULES MODELES UTILISEES POUR LES MISES AU POINT. A GAUCHE : FORMULE CHIMIQUE DES NANOPARTICULES, AU MILIEU : TAILLE OBSERVEE EN DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE, A DROITE : PARTICULES OBSERVEES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.

### **8.1.1.2 ECHANTILLONS DE SPERME**

Les échantillons de sperme ayant servi à la mise au point du protocole ont été collectés à partir du reliquat de prélèvement réalisé par les patients du centre de Biologie de la Reproduction. Une notice d'information était remise au patient par la secrétaire médicale du service avant la consultation, ce dernier pouvait ensuite poser toutes les questions qu'il souhaitait au médecin lors de la consultation et avait également la possibilité de s'opposer à son inclusion. L'étude a été validée par le comité d'éthique de Saint-Etienne.

Le prélèvement a été effectué conformément aux pratiques habituellement en vigueur au sein du laboratoire. Le patient était isolé dans une salle dédiée à cet effet. Après un lavage soigneux des mains et une désinfection de la verge à l'aide d'un flacon de chlorhexidine à usage unique et de compresses stériles, il réalisait le prélèvement par masturbation dans un pot stérile. Le prélèvement était ensuite récupéré par l'équipe technique du laboratoire et divisé en deux fractions distinctes. La première fraction était dédiée aux examens prescrits au patient. La seconde était congelée à -20°C en vue des analyses minéralogiques. Une évaluation de la numération et de la mobilité entre lame et lamelle était réalisée.

### **8.1.1.3 SEPARATION SUR GRADIENT DE DENSITE.**

La première étape mise au point a été une séparation sur gradient de Percoll<sup>§</sup>.

Une fois décongelés, les prélèvements ont été dilués au dixième dans de l'eau désionisée, afin d'obtenir un volume d'1ml pour chaque prélèvement. Puis les particules modèles ont été ajoutées à la concentration de 0,1 g/l.

Pour chaque particule testée, plusieurs échantillons étaient réalisés et analysés en DLS.

- Témoin (Eau désionisée)
- Sperme seul (3 spermatozoïdes différents ont été analysés séparément)
- Nanoparticules seules (2 échantillons pour chacune d'entre elles, du fait d'un manque de reproductibilité des mesures)
- Nanoparticules et sperme.

---

<sup>§</sup> Solution contenant des particules de silicates colloïdales de 15-30 nm de diamètre qui sont recouverts de polyvinylpyrrolidone

Les échantillons ont été vortexés puis déposés sur un gradient de Percoll constitué de trois couches de 1 ml de Percoll de concentration décroissante : 90%, 70% et 50%. L'ensemble a été centrifugé (1500 rpm pendant 25 min). Le surnageant et les parties supérieures du gradient de Percoll contenant les éléments biologiques ont été éliminés. Le culot, contenant en théorie les particules, a ensuite été lavé à deux reprises (2000 rpm pendant 10 min) afin d'éliminer le Percoll, puis repris dans 1 ml d'eau désionisée avant d'être à nouveau analysé en DLS.

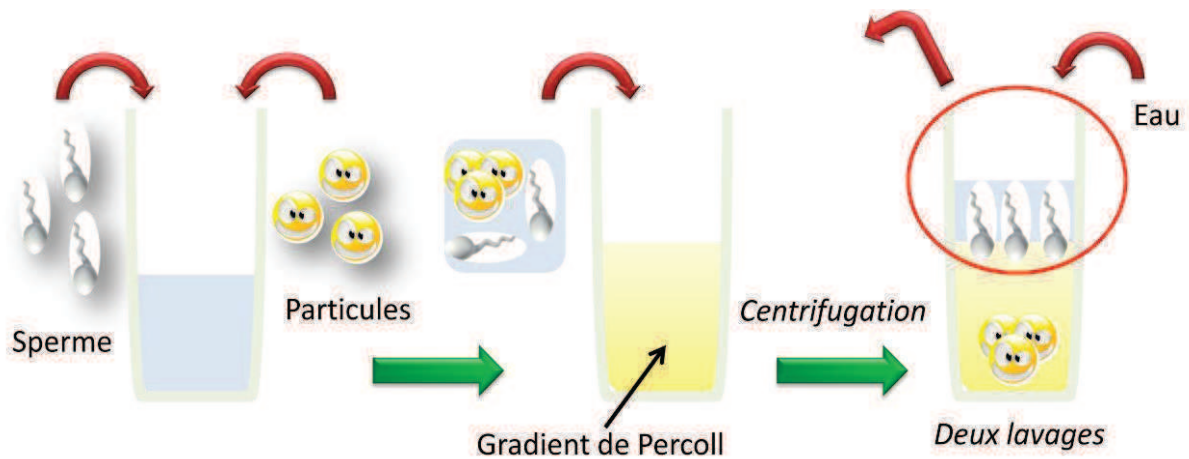


FIGURE 37 : SCHEMA PRESENTANT LE PROTOCOLE DE SEPARATION SUR GRADIENT DE PERCOLL.

#### 8.1.1.4 DETECTION DU SIGNAL EN DLS

Les analyses en diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées à l'école des mines de Saint-Etienne sur l'automate Nanozetasizer (NanoZS, Malvern Instruments). L'indice de réfraction était fixé à 1,45, la température d'analyse était de 25°C, la hauteur du faisceau était de 1,25 mm, il n'y avait pas de temps d'équilibrage. Avant chaque mesure, l'échantillon était vortexé. Chaque mesure a été répétée trois fois avant et après traitement sur gradient de Percoll.

Le signal obtenu pour les particules d'aluminium est présenté dans la Figure 38. Après gradient on observe une excellente élimination du signal biologique. Le rendement d'extraction, mesuré par le rapport : signal obtenu avant gradient sur signal obtenu après gradient, est de 67,5% en l'absence de sperme et de 47,5% en présence de sperme.



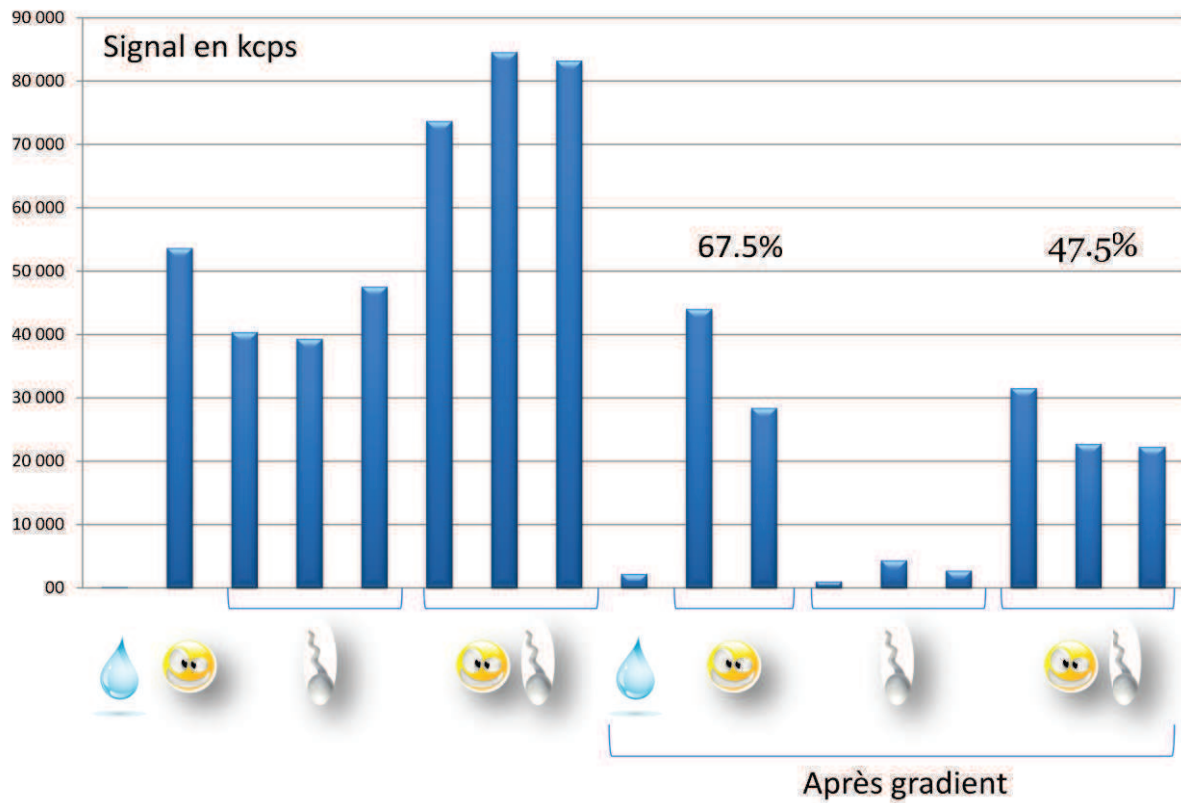


FIGURE 38 : SIGNAL OBSERVE EN DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE EXPRIME EN KILOCOUPS PAR SECONDE (KCPS) POUR LES NANOPARTICULES D'ARGENT SEULES, LE SPERME SEUL ET LES NANOPARTICULES D'ARGENT ET LE SPERME, AVANT ET APRES GRADIENT.

Les analyses réalisées en microscopie électronique à balayage confirment les résultats obtenus en DLS avec des images de particules bien visibles après gradient et un faible bruit de fond biologique.

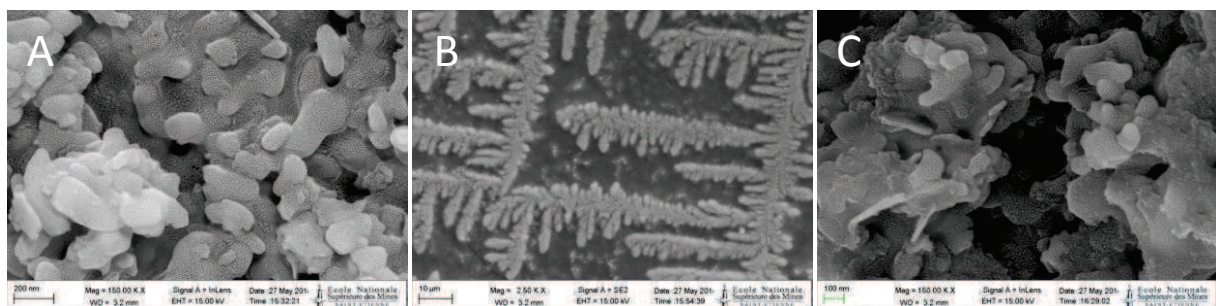


FIGURE 39 : IMAGES DES PARTICULES D'ALUMINIUM OBSERVEES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE. A : PARTICULES ISOLEES. B : PARTICULES EN PRESENCE DE SPERME AVANT GRADIENT. LE SPERME MASQUE TOTALEMENT LA PRESENCE DES PARTICULES, L'ASPECT EN FEUILLE DE FOUGERE EST LIE A LA CRISTALLISATION DES ELECTROLYTES PRESENTS DANS LE PLASMA SEMINAL. C : PARTICULES EN PRESENCE DE SPERME APRES GRADIENT.

Les bons résultats obtenus pour l'aluminium contrastent avec les mauvais résultats obtenus pour les autres particules puisque le rendement d'extraction obtenu en DLS avant et après gradient est proche de zéro pour les trois autres particules. Nous avons attribué cette différence à la taille et à la

masse moindre des autres particules ainsi qu'à leur faible agglomération spontanée réduisant leur capacité à franchir le gradient.

#### **8.1.1.5 CALCUL DU POINT ISOELECTRIQUE ET AGGLOMERATION PREALABLE DES PARTICULES**

Afin de faciliter le franchissement du gradient par les particules, nous avons souhaité maximiser leur agglomération. Cette agglomération est augmentée par la neutralisation des charges de surface des particules qui peut être obtenue par modification du pH de la solution pour le rapprocher du point isoélectrique des particules et par l'augmentation de la force ionique<sup>\*\*</sup> de la solution. Pour ce faire, le point isoélectrique de chaque particule a été mesuré de la façon suivante :

- les nanoparticules ont été dispersées dans une solution saline à pH 12.
- le pH a ensuite été diminué progressivement par une solution d'acide chlorhydrique concentrée.
- une mesure de la charge de surface des particules en DLS a été effectuée à chaque pallier.

Les résultats sont présentés dans la Figure 40 et montrent un point isoélectrique situé entre pH 8 et pH 10 pour les quatre particules.

---

<sup>\*\*</sup> La force ionique est une grandeur qui définit l'activité des ions dans une solution aqueuse.

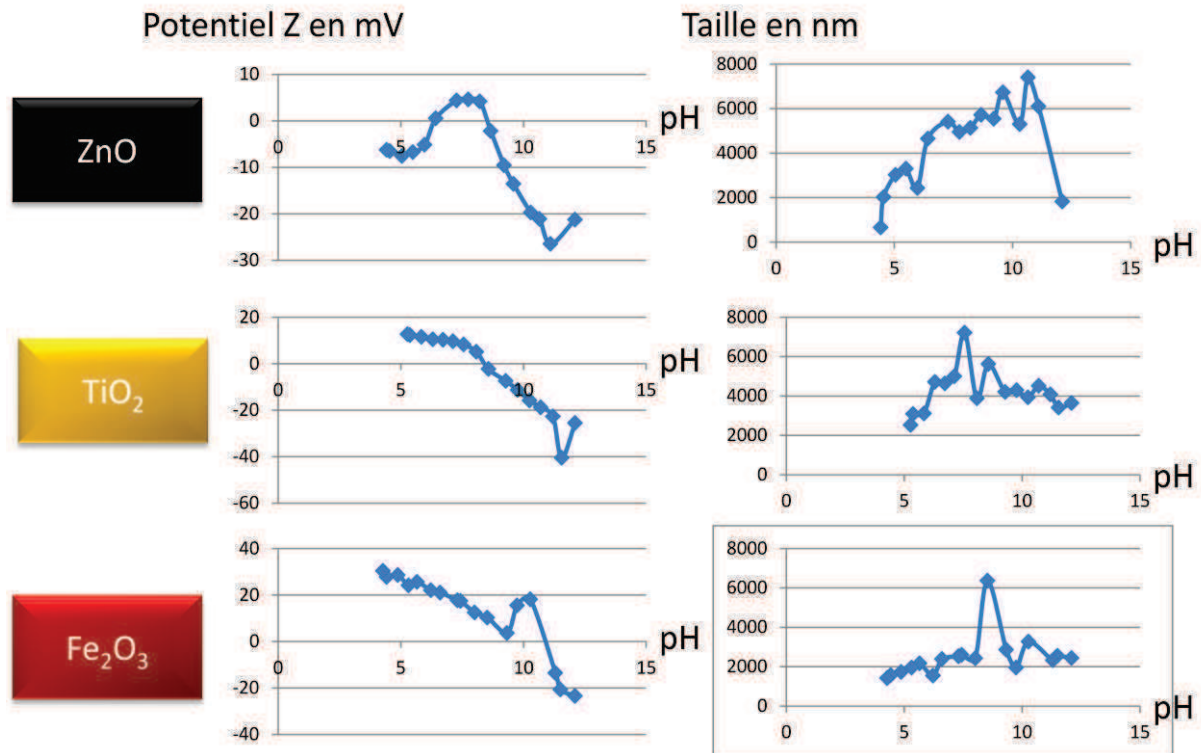


FIGURE 40 : MESURE DU POINT ISOELECTRIQUE DES PARTICULES DE ZINC, DE TITANE ET DE FER. AU MILIEU : CHARGE DE SURFACE (OU POTENTIEL Z) EN FONCTION DU PH. LE POINT ISOELECTRIQUE CORRESPOND AU PH POUR LEQUEL LES PARTICULES ONT UNE CHARGE DE SURFACE (OU POTENTIEL ZETA) EGALE A 0. A DROITE, TAILLE DES PARTICULES EN FONCTION DU PH, LES TAILLES LES PLUS ELEVEES CORRESPONDENT A UNE AGGLOMERATION MAXIMALE DES PARTICULES.

Une fois les données obtenues, une nouvelle série de mesures a été réalisée pour chacune des particules en prenant soin de tamponner chaque échantillon par une solution de chlorure de sodium à 0,9% à pH 10 avant le traitement sur gradient. Le rendement d'extraction a été amélioré et atteint 40% pour les nanoparticules de fer et 62% pour les nanoparticules de titane en l'absence de sperme. En revanche, en présence de sperme ou pour les particules de zinc, ce rendement reste proche de zéro. Les résultats obtenus pour les particules de fer sont présentées en Figure 41.

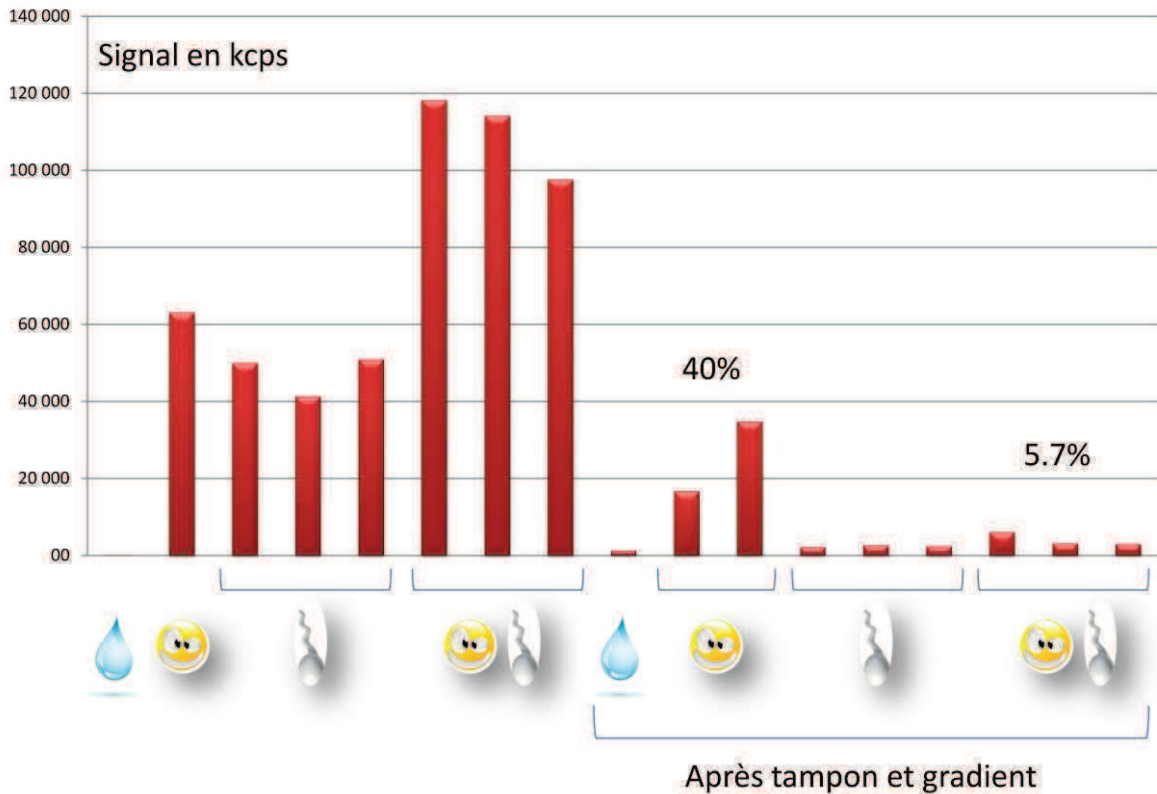


FIGURE 41 : SIGNAL OBSERVE EN DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE EXPRIME EN KILOCOUPS PAR SECONDE (KCPS) POUR LES NANOPARTICULES DE FER SEULES, LE SPERME SEUL ET LES NANOPARTICULES DE FER ET LE SPERME, AVANT ET APRES REPRISE DANS LE TAMPON (NACL 0,9% A PH 10) PUIS GRADIENT.

#### 8.1.1.6 LIMITES DE DETECTION DE LA DLS

Afin de connaître la sensibilité de la DLS, le seuil de détection de celle-ci a été recherché en mesurant le signal de chaque nanoparticule dans l'eau. Une gamme d'étalonnage allant de 1 g/l jusqu'à  $1.10^{-5}$  g/l a été réalisée (Figure 42).

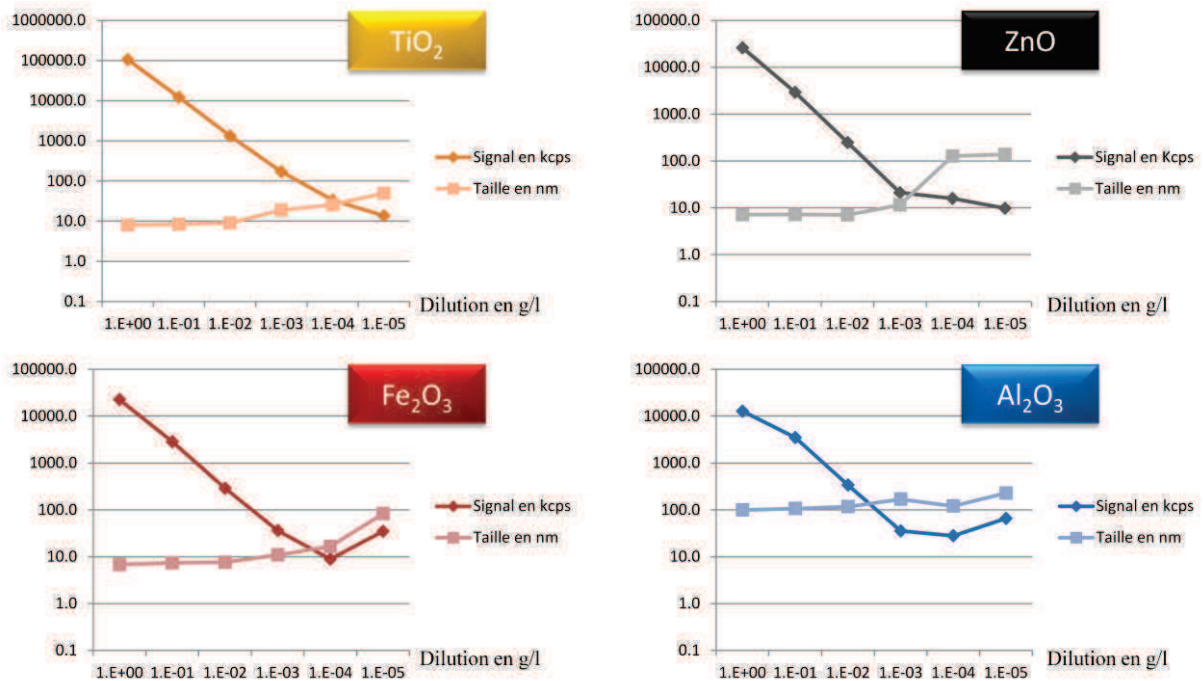


FIGURE 42 : MESURE DU SEUIL DE DETECTION DES PARTICULES EN DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE. POUR CHAQUE PARTICULE, LE SIGNAL EN KILOCOUPS PAR SECONDE (KPCS) ET LA TAILLE DES PARTICULES EST DONNE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PARTICULES.

Pour les nanoparticules d'Oxyde d'Aluminium et d'Oxyde de Zinc, la courbe du signal n'est plus linéaire aux alentours de  $1.10^{-3}$  g/l. De plus, à partir de cette concentration, la courbe représentant la taille des nanoparticules augmente témoignant d'une difficulté de la DLS à détecter les particules à partir de ce seuil.

Pour les nanoparticules d'Oxyde de Titane et d'Oxyde de Fer, le seuil de détection semble être un peu meilleur : autour de  $1.10^{-4}$  g/l.

### 8.1.1.7 CONCLUSIONS CONCERNANT L'EXTRACTION DES NANOPARTICULES COUPLEE A L'ANALYSE EN DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE

La démarche décrite dans ce chapitre pour détecter les nanoparticules dans le sperme humain présente deux écueils majeurs :

- Tout d'abord le protocole d'extraction ne permet pas d'extraire les particules les plus petites et ne présentant pas d'agglomération spontanée, or comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique (voir paragraphe 4.5.1.2), ce sont les particules les plus petites et qui s'agglomèrent le moins qui sont le plus susceptibles de se distribuer vers le testicule. Il semble donc logique que ce soit également celles qui aient le plus de chance d'être présentes dans le sperme des patients.

- Ensuite les limites de détection observées en DLS sont insuffisantes compte-tenu des quantités de particules attendues dans le sperme humain. Pour prendre l'exemple des particules d'aluminium, lors d'une étude réalisée sur 62 patients (voir chapitre 8.1.2) la quantité moyenne d'aluminium mesurée en SAA dans les échantillons de sperme était de 339 µg/L. Or en DLS le seuil de détection retrouvé était  $10^{-3}$  g/L de particules d'AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> soit 543 µg/L d'élément aluminium. Il s'agit là d'un seuil de détection théorique donné pour une extraction complète et une élimination de la totalité du signal biologique et de tout autre signal parasite pouvant perturber les mesures. De plus, on ne parle là que du seuil de détection mais d'après **le manuel de l'automate** la concentration à partir de laquelle la taille des nanoparticules donnée par la DSL est fiable est bien plus élevée (0,1g/L pour des particules de 10 à 100 nm)<sup>166</sup>.

Ainsi cette approche a été jugée insuffisante et une autre méthodologie de la détection des nanoparticules dans le sperme humain a été envisagée.

### **8.1.2 RETRAIT DU MATERIEL BIOLOGIQUE ET ANALYSE EN DLS, ICP-AES ET MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.**

Cette approche, bien que reprenant de nombreuses idées de la précédente, avait pour objectif, non plus l'extraction des nanoparticules, mais le retrait en étapes successives de l'ensemble des éléments biologiques pour ne garder que les nanoparticules. Une telle approche devait nous permettre de surmonter notre incapacité à extraire les particules les plus petites et ne présentant pas d'agglomération spontanée. En pratique le protocole mis au point ne permet pas non plus de récupérer l'ensemble des particules présentes dans un échantillon de sperme mais les rendements semblent tout de même supérieurs à l'approche précédente.

Ce protocole a ensuite été appliqué dans le cadre d'une étude préliminaire de type cas-témoin, c'est-à-dire une étude dans lequel deux groupes de patients sont définis : des patients présentant la maladie, en l'occurrence une oligozoospermie, et des patients dépourvus de celle-ci, c'est-à-dire ayant un nombre de spermatozoïdes normal.

L'article présentant ces travaux n'est pas encore achevé. Il est présenté ici à l'état de brouillon et des modifications sont susceptibles d'être réalisées avant une publication prochaine.



# Nanoparticles content of human semen: implication for sperm count

---

## **Abstract**

A deterioration in sperm count in most developed countries has been recorded during the last 50 years. At the same time, metal, metal oxide and metalloid nanoparticles have gained in popularity in the construction, high-tech and medical fields, among others. Consequently, the evaluation of their potential toxicity on the human reproductive system is becoming an emerging concern of the scientific community.

The final aim of the current study was to explore the association between the presence of nano-sized particles and men's oligozoospermia within a small patient group. Therefore, our objective was to develop a simple and effective method of evaluating the nanoparticulate load of human semen.

Firstly, we added citrate-coated, spherical gold (Au) nanoparticles (60nm) in a sperm pool of 20 healthy men and based on this sample we developed a method of isolating nanoparticles from human semen after. The method's efficiency was measured by its ability to decrease the spermatozoa count and protein concentration as well as its ability to quantitatively retrieve the added amount of Au nanoparticles. Upon their isolation from semen, the physicochemical characterization of nanoparticles was performed by means of dynamic light scattering, inductively-coupled plasma optical emission spectroscopy, scanning electron microscopy and back-scatter electron microscopy. We subsequently applied this method to 9 oligozoospermic patients and 9 non-oligozoospermic men in order to evaluate the presence of nanoparticles in their semen.

The developed method allows for near-quantitative retrieval and observation under electron microscopy of said Au nanoparticles from a liquid biological sample of very high protein and cellular content. Its application on a small cohort revealed a low amount of silicon-containing nanoparticles in both oligozoospermic patients and healthy men, according to the elemental analysis. The presence of suspended particles results was found to be dependent on the initial spermatozoa load of each patient, but certain outliers were deemed susceptible of carrying

particulate matter, too. In conclusion, our proposed technique constitutes a solid first step towards the routine detection and analysis of a wide variety of nanoparticles in human semen which is a prerequisite for the reprotoxic investigation of nanoparticles.

## **Introduction**

Nanomaterials are usually defined as objects with at least one dimension in the 1 and 100 nm range (International Organization for Standardization, 2008), even if more recent standards try to widen this definition to particles smaller than 500 nm under certain conditions (Vert et al., 2012). Humans have been exposed to environmental nanoparticles for a very long time through volcanic eruptions, forest fires and sand dust. However, this exposure has increased due to industrial activities and car pollution (Gaffet, 2011). Moreover, during the last 20 years, nanotechnologies have been integrated to applications in various fields, such as informatics, cosmetics, textiles, and medicine. This has led to increasing exposure to nanoparticles and nanomaterials. Many studies have already shown that nanoparticles are able to penetrate natural barriers, especially the alveolo-capillary barrier (Kreyling et al., 2014) and undergo a system-wide distribution with unknown long-term repercussions.

In parallel, we have witnessed the deterioration of human semen parameters, especially sperm count (Swan et al., 1997). In France, despite some regional differences, most major studies indicate a decline in sperm count since 1973 (Auger et al., 1995; de Mouzon et al., 1996; Geoffroy-Siraudin et al., 2012; Rolland et al., 2013). This phenomenon is most likely due to environmental factors. While some of them are already known (pesticides, tobacco,...) (Colborn and Carroll, 2007; Jensen et al., 2005), others might still remain undiscovered.

*In vitro* studies have already revealed that some nanoparticles can have toxic effects on germinal cells. Bradyche-Stolle et al. showed that silver nanoparticles over a certain concentration (>10 µg/ml) are able to enter spermatogonial stem cells, impair mitochondrial function, cause LDH leakage, reduce cell proliferation through reduction of signal transduction from glial cell-derived neurotrophic factor and slightly increase apoptosis (Braydich-Stolle et al., 2005, 2010). These phenomena seem to be more important for nanoparticulate rather than for soluble silver and the

smaller their size, the greater their toxicity seems to be. They also showed that nanoparticles' toxicity depends on their chemical composition as silver nanoparticles tend to be more toxic than molybdenum or aluminum nanoparticles. Asare et al. confirmed these findings showing that silver nanoparticles induced necrosis and apoptosis from 10 µg/ml on human testicular embryonic carcinoma cell line and primary mice testicular cells while titanium dioxide nanoparticles tend to increase proliferation of mice testicular cells (Asare et al., 2012).

Animal model studies have also revealed the potential toxicity of nanoparticles on spermatogenesis. However, findings differ depending on the type of nanoparticle, quantity and route of exposure. Intravenously injected carbon nanotubes and silver nanoparticles at 0.5 mg/kg for 5 days (Bai et al., 2010) and at 1 mg/kg every three days for 15 days (Garcia et al., 2014), respectively, as well as orally administered titanium dioxide nanoparticles at 250 mg/kg/j for 42 days (Jia et al., 2014) do not reduce daily sperm production or epididymal sperm number in mice. Conversely, a single intravenous injection of 5mg/kg silver nanoparticles in rats, caused a slight decrease in epididymal sperm count (Gromadzka-Ostrowska et al., 2012). Similarly, inhalation of 0.1 mg carbon black nanoparticles every day for a week, reduced daily sperm production in mice (Yoshida et al., 2009). In a study that investigated the effect of wear debris from metal-on-metal prostheses on male fertility, Wang et al. found that intra-articular injection of cobalt-chromium nanoparticles above 500 mg/kg/week for 10 weeks could reduce epididymal sperm count in rats (Wang et al., 2013). Finally, some studies have observed only transitory effect of nanoparticles on spermatogenesis, like Xu et al. who found that silica nanoparticles intravenously injected at 20 mg/kg every 3 days for 13 days in mice could reversibly impair spermatogenesis for about a whole spermatogenesis period (Xu et al., 2014).

The conclusion of the above *in vitro* and *in vivo* is that nanoparticles may impair spermatogenesis and reduce sperm count under specific conditions. Nevertheless, there are no clinical studies to corroborate these findings. Still, with humans being exposed to numerous factors that may either amplify or dissipate the effect of nanoparticles, human centric research is crucial. Moreover, the level of human exposure is estimated to be much lower than found in animal or *in vitro* studies. Because voluntary human exposure is unethical for obvious reasons and accurate estimation of the real-world exposure is still elusive, it appears necessary to develop a method that allows for the assessment of the nanoparticulate load of complex, human biological samples.

We have elsewhere described how analyzing nanoparticles in human biological milieu is a daunting task, especially when the analytes are of unknown nature and/or abundance (Bitounis et al, under submission). Consequently, dedicated procedures have to be developed for the isolation of nanoparticles from within biological fluids and, to our knowledge, there are no such studies tailored to human semen.

The aim of the current study was to explore a possible association between the presence of nanoparticles in human semen and the concurrence of oligozoospermia. We worked towards this goal by designing a simple method that allowed for the near-quantitative isolation of citrate-coated, spherical Au nanoparticles with a nominal diameter of 60nm from within a semen sample pooled from ejaculates of 20 healthy men. The steps followed in the methodology are partially based on recommendations made by the American Society of Testing and Materials (ASTM) and the International Standards Organization (ISO) for the *ex vivo* treatment of biological fluids that contain exogenous particles (ASTM International, 2013; ISO, 2011). Another useful resource was a comprehensive review on the detection of nanomaterials in complex matrices by von der Kammer et al. In short we employed a combination of physical (sonication, single-step gradient centrifugation) and chemical (dispersion buffer, oxidant) treatments in order to retrieve the nanoparticles with which we had spiked the semen mix. Once performed, the methodology enabled the qualitative evaluation of the purified nanoparticles by means of dynamic light scattering (DLS), field emission scanning electron microscopy (FESEM) while its quantitative efficiency was measured by inductively-coupled optical emission spectroscopy (ICP-OES). The suitability of our method was also tested against other types of nanomaterials, namely SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO nanoparticles and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanorods.

## **Materials and Methods**

### **Patient population**

For the clinical study, 18 subjects were recruited among patients consulting at the *Saint-Etienne* Reproductive Center (France). Among them, 9 presented either with oligozoospermia (sperm count lower than normal) or azoospermia (non-detectable levels of sperm cells) and 9 had a normal sperm count (>39M/ml).

All semen samples were collected by masturbation after 3-5 days of sexual abstinence and sperm parameters were evaluated following the World Health Organization guidelines (WHO, 2010). Patients were included in the study after having been informed about its purpose and having given their consent, in accordance with relevant French legislation. This study has been approved by the ethics committee of the Saint-Etienne University Hospital.

### **Au nanoparticles characterization**

The polydispersity and hydrodynamic size of spherical, citrate-coated, Au nanoparticles of 60nm nominal diameter stabilized in 0.1mM PBS 1x (Sigma-Aldrich, France) were measured with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) using 10mm-path length disposable polystyrene cuvettes (Kartell, Italy). Their zeta-potential was measured using disposable, folded, plastic capillary cells purchased by Malvern Instruments. The particles' primary particle size and morphology was verified by means of transmission electron microscopy (TEM) with a Philips CM 200 instrument operating at 200kV and a Carl Zeiss Ultra 55 FESEM. Energy-dispersive X-Ray (EDX) spectroscopy and BSE imaging were performed as well using the same TEM and FESEM instruments, respectively.

### Isolation of Au nanoparticles from human semen

All chemicals mentioned in this section were of at least 99% analytical purity, were diluted with Milli-Q® water and purchased by Sigma-Aldrich, France, unless otherwise noted. All centrifugation steps were performed in a swinging-bucket rotor. For the development of the nanoparticles isolation method, semen samples from 20 men with normal sperm parameters were pooled and a 100× penicillin-streptomycin mixture (Biowest SAS, France) was added at a final

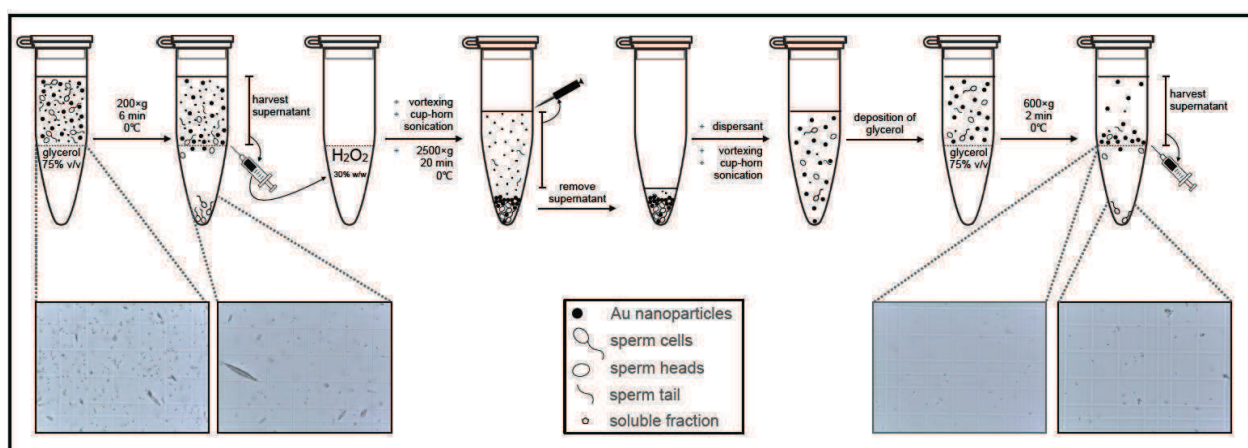
concentration of 5% v/v. Between experiments, pooled semen was stored at -20°C, protected from light and sealed airtight. The extraction procedure is presented in Figure 1.

500µl of pooled semen were placed in a 2ml Protein Lobind® tube (Eppendorf AG, Germany), Au NP were added at a final concentration of 4µg/ml and the mixture was vortexed at room temperature (RT) for a few seconds. Then, 500µl of 75% v/v glycerol were slowly deposited beneath the sample with the help of a manual pipette. The sample was centrifuged at 200 ×g for 6 min at 0°C in order to pellet out the spermatozoa.

The tube was then pierced at the interface of glycerol and semen using 22G×1<sup>1/2</sup> needles (Terumo©) and 2ml luer syringes (Codan SARL, France) and the supernatant was harvested (500µl). It was then added to a new tube loaded with 500µl of 30% v/v hydrogen peroxide. The tube was sealed, vortexed and sonicated for 30 sec in a 2-inch cup-horn sonicator at 70% amplitude (Branson Ultrasonics, USA). The tube was left at RT for 10 min and then centrifuged at 2500×g for 20 min at 0°C in order to pellet out the Au nanoparticles as well as any remaining sperm cells. The soluble fraction was carefully removed (950µl) and 250µl of a dispersion buffer (50mM Tris-base, 0.1w/v sodium dodecyl sulphate, 150mM NaCl, 0.5w/v sodium deoxycholate, 0.8v/v % Triton X-100) were added to the pellet. The tube was vortexed and sonicated at RT until the pellet was no longer visible and the resulting dispersion was reconstituted to 1ml with the addition of deionized water.

Another 500µl of 75% v/v glycerol were slowly deposited underneath the dispersion and the tube was centrifuged at 600×g for 2 min at 0°C in order to pellet any remaining cells. Finally, the tube was pierced at the interface of the two fractions and the particle-containing supernatant was harvested (1000µl) in order to be used for particle analysis.





**Figure 1: Nanoparticles extraction procedure.**

The above methodology was also applied on pooled semen without any prior addition of nanoparticles (negative control) and on deionized water (blank). In case we had to apply the methodology twice on any of the 18 patients included in the clinical study, the utilized semen volume had to be 370 $\mu$ l, given that for some patients sample volume did not exceed  $\sim$ 750 $\mu$ l.

### **Sperm cell count and total protein quantification**

Spermatozoa concentration was calculated with the use of a Thoma counting chamber for both the pooled semen sample and the ultimate fraction retrieved from the above methodology.

Total protein concentration was measured for the plasma fraction of pooled semen after it was retrieved by centrifuging a 1:1 dilution of 500 $\mu$ l sample in deionized water at 2500 $\times$ g for 20 min at 0 $^{\circ}$ C in a swinging bucket rotor. The retrieved liquid was further diluted by a factor of 20 $\times$  in deionized water before measuring its protein content using the Pierce<sup>TM</sup> 660nmProtein Assay Kit (Thermo Scientific), according to the manufacturer's instructions.

The protein concentration in the ultimate fraction was measured with the use of the same kit but after replacing the dispersant with deionized water. In brief, 500 $\mu$ l were placed in an Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 centrifugal filter tube (Merck Millipore, Germany) with a molecular weight cut-off (MWCO) of 3kDa and were centrifuged at 2500 $\times$ g for 1h min at 25 $^{\circ}$ C in a swinging bucket rotor. The concentrate was reconstituted to its original volume with deionized water and its protein content was measured as mentioned above.

## **Physicochemical characterization of ultimate fractions**

### ***ICP-OES analyses***

Fractions from the blank, pooled semen with Au nanoparticles and negative control:

Within 1h from their isolation, 500µl of the ultimate fractions were 10x diluted with deionized water, transferred to soda-lime glass tubes and Au content was measured by ICP-OES (Jobin-Yvon Jy138 Ultrace).

Fractions from the semen of patients in the clinical study:

Within 1h from their isolation, 500µl of the ultimate fractions were 10x diluted with deionized water, transferred to soda-lime glass tubes and aluminium, iron, silicon, silver and titanium contents were measured by ICP-OES (Jobin-Yvon Jy138 Ultrace).

### ***DLS measurements***

DLS measurement for the fractions from the blank, pooled semen with Au nanoparticles and negative control were performed with a Zetasizer Nano ZS using 12mm disposable polystyrene cuvettes. For the fractions from the semen of patients in the clinical study we used 70µl PMMA microcuvettes optical cuvettes (Brand GMBH + CO KG, Germany). We set the equilibration time at 2 min, temperature at 25°C, refraction index at 1.45, measure angle at 173°. The attenuator, number of signal acquisition and measurement position were automatically adjusted by the instrument during each run and all measurements were repeated in triplicate.

### ***Electron microscopy***

In a 2ml Protein Lobind® tube, 100µl of the ultimate fractions were washed with 1,000 ml of deionized water by briefly vortexing and centrifuging them at 2500×g for 10 min at RT in a swinging bucket rotor. 1,000ml of the supernatant was discarded and the wash cycle was repeated twice more.

Mica sheets were placed on FESEM specimen mounts and were then coated with a 50nm high-resolution carbon layer. To immobilize the sheets and minimize charge effects, conductive tape connected the edges of the mica sheet with the rim of the mount. An 1-2µl droplet of the as previously washed sample was deposited on the coated surface of the mica sheet and was left to dry protected from dust. Images were obtained using the angular selective back-scatter detector

operated between 10 and 20keV and with the in-lens secondary electron detector operated at 1keV.

### **Statistical analyses**

Normality of distribution was checked for patient age, sperm count (in million/ml), DLS measurement signal intensity in kilo-counts per second (kcps) and ICP-OES signal (A.U.) using a Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons of mean age, mean element concentration in semen and mean DLS signal between the nine patients with normal sperm count and the nine patients with low sperm count were performed using a Student's t-test. Correlation coefficient ( $r$ ) was calculated between element concentration in semen, sperm count and DLS signal and its significance was tested using a Student's t-test. For comparison of qualitative data a Chi square test was used. The criterion for statistical significance was  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **Patient population**

Eighteen patients have been included in the study, nine with a normal sperm count ( $>39$  M / ejaculate) and nine with an oligozoospermia. Patients' data are summarized in Table 2. In the normal sperm count patients, mean age was 36.9 ( $\pm 7.4$ ) years, mean sperm count was 285.2 ( $\pm 186.7$ ), percent of patients with children was 56 % and percent of smokers or former smokers was 56 %. In oligozoospermic patients, mean age was 36.2 ( $\pm 6.4$ ) years, mean sperm count was 11.4 ( $\pm 13.7$ ), percent of patients with children was 22 % and percent of smokers or ancient smokers was 44 %. Aside from mean sperm count, none of these clinical data were statistically different between the two groups.

**Table 1 : Comparison of clinical data between patients with normal sperm count and low sperm count. NS: Non Significant, ND Not Detectable**

	<b>Patients with normal sperm count</b>	<b>Oligozoospermic patients</b>	<b>p value</b>
<b>Number of patients</b>	9	9	
<b>Mean Age (years)</b>	36.9 ( $\pm 7.4$ )	36.2 ( $\pm 6.4$ )	NS (p = 0.84)
<b>Patients with children (%)</b>	56	22	NS (p = 0.32)
<b>Smokers or former smokers (%)</b>	56	44	NS (p = 0.97)
<b>Mean sperm count (M/mL in ejaculate)</b>	285.2 ( $\pm 186.7$ )	11.4 ( $\pm 13.7$ )	p = 0.0005

### **Au nanoparticles characterization**

The colloidal properties of Au nanoparticles dispersed in deionized water were measured by DLS. Hydrodynamic diameter was 74.8 ( $\pm 0.2$ ) nm and z-potential was -44.3 ( $\pm 0.2$ ) mV.

### **Sperm cell count and total protein quantification**

The number of cells/ml in the pooled semen was 24M/ml and the total protein concentration of its plasma 9.953mg/ml. Upon applying the nanoparticles isolation procedure, these values decreased to 3M/ml and 0.028mg/ml respectively, which signifies a reduction of the biological background

by 99.7% for proteins and 87.5% for cells. The removal of after each centrifugation until the ultimately harvested fraction can be seen in Figure 1.

### **Sperm cell count and total protein quantification**

The number of cells/ml in the pooled semen was 24M/ml and the total protein concentration of its plasma 9.953mg/ml. Upon applying our proposed nanoparticles isolation procedure, these values decreased to 0.028mg/ml and 3M/ml respectively, which signifies a reduction of the biological background by 99.7% for proteins and 87.5% for cells. The removal of after each centrifugation until the ultimately harvested fraction can be seen in Figure 1.

### **Physicochemical characterization of ultimate fractions**

#### ***Blank, negative control and pooled semen with Au nanoparticles***

Comparison of DLS values obtained for the blank, negative control and pooled semen spiked with Au nanoparticles at 4µg/ml showed that:

the as followed procedure does not introduce particulate contamination,  
the negative control contains a strongly scattering population of particles and that  
the presence of Au nanoparticles at the aforementioned concentration is detectable with  
kcps values significantly increased from the negative sample ( $p= 0.0011$ ).

Results from the ICP-OES measurements of the same samples follow a similar pattern. Au levels in the blank sample are non-detectable and the extraction yield for the nanoparticles was calculated to be higher than 80%. We were able to show that most particles were lost during the first centrifugation because if Au nanoparticles were added after the first centrifugation, the extraction yield rised to 99.7%. The values and statistical parameters of the DLS and ICP-OES experiments are summarized in Table 2. Finally, extraction yields for SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO nanoparticles and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanorods were also evaluated, albeit solely by means of ICP-OES, and the results can be found in Table 3. In brief, the quantitative extraction of those nanomaterials was less efficient (4 - 49%), even when concentrations as high as 80µg/ml were used.

**Table 2 : ICP-OES and DLS analysis of pooled semen spiked with Au after nanoparticles extraction procedure**

Ultimate fractions	ICP-OES intensity (A.U.)	DLS signal (kcps)
<b>Positive control (spiked pooled semen)</b>	8195 ( $\sigma= 219$ )	25394 ( $\sigma= 1101$ )
<b>Negative control (pooled semen)</b>	Missing Data	20030 ( $\sigma= 161$ )
<b>Blank (deionized water)</b>	Missing Data	244 ( $\sigma=13$ )

**Table 3: Yield measurement in ICP-AES of our extraction procedure. Overall preanalytical and analytical dilution was 1/14. ND: Non detectable.**

	Semen alone (mean value of 9 measures) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Particles added after extraction procedure ( $\mu\text{g/mL}$ )	First sample ( $\mu\text{g/mL}$ )	Second sample ( $\mu\text{g/mL}$ )	Third sample ( $\mu\text{g/mL}$ )	Mean procedure yield (%)
ZnO	0,52	3,13	0,35	0,63	0,91	<b>4</b>
TiO <sub>2</sub>	ND	3,28	1,05	1,14	1,28	<b>35</b>
SiO <sub>2</sub>	0,49	2,92	1,31	1,31	0,96	<b>29</b>
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<0,01	2,24	0,95	1,22	1,14	<b>49</b>
Au	ND	0,198	0,159	0,164	0,156	<b>81</b>
Ag	ND	0,154	0,023	0,024	0,020	<b>19</b>

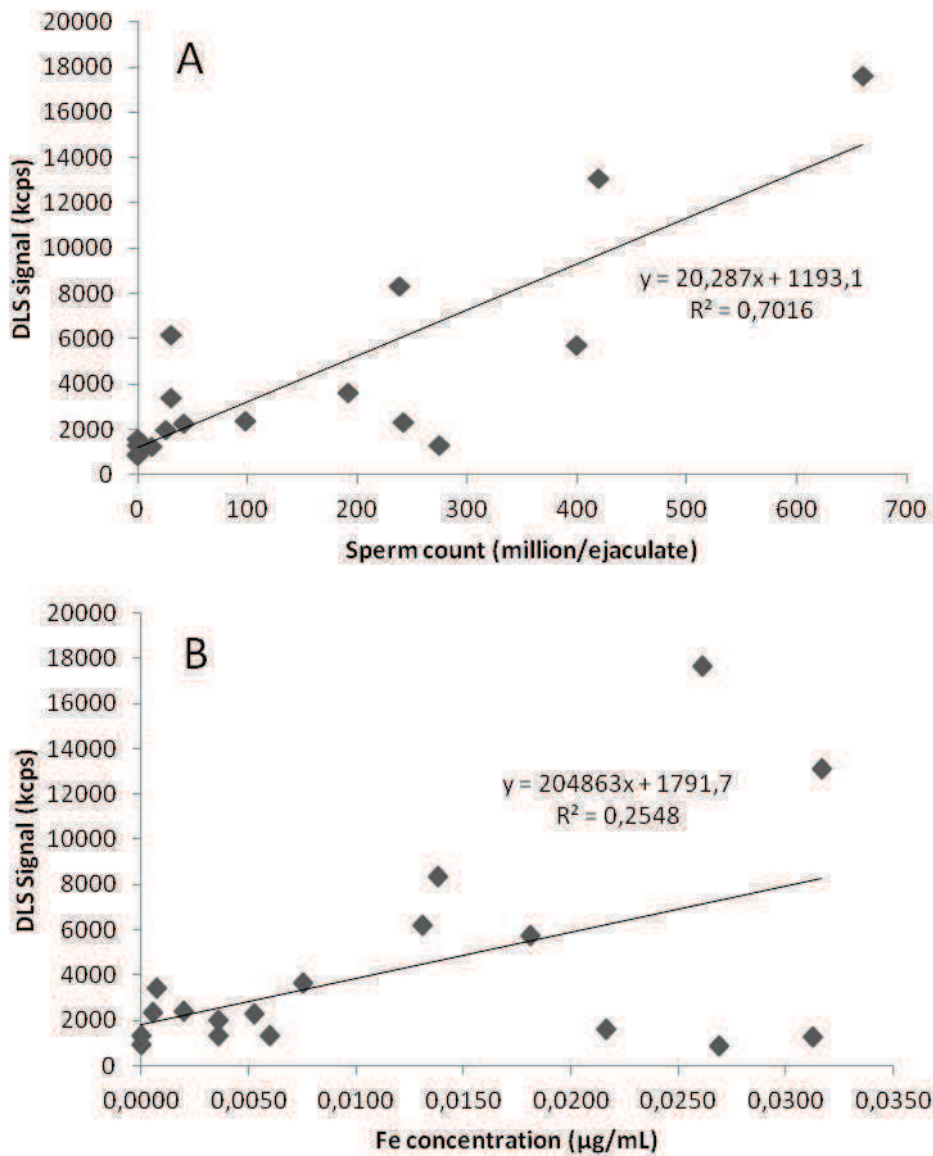
### ***Samples of patients included in the clinical study***

The retrieved DLS signals from the ultimate fractions of the patients with normal sperm count were significantly higher than those from the low sperm count ( $p=0.0493$ ). Due to the small amount of biological species that were not removed, a good linear correlation ( $r=0.84$ ) between sperm count and DLS signal could be extrapolated: the higher the original sperm count, the higher was the obtained kcps value.

All measured ICP-OES signals of the ultimate fractions were either below the detection limit or comparable to the blank values for Ag, Al and Ti. The mean values for Fe and Si were not



significantly different between the two groups, although Si was markedly elevated for the low sperm-count group. An average correlation was also observed between Fe concentration and kcps ( $r=0.51$ ); nevertheless, the correlation between Fe concentration and sperm count was weaker ( $r=0.39$ ).



**Figure 2: Correlation graph between sperm count and DLS signal (A) and iron concentration and DLS signal (B). DLS: Dynamic Light Scattering; kcps: kilo counts per second; Fe: iron;  $R^2$ : coefficient of determination.**

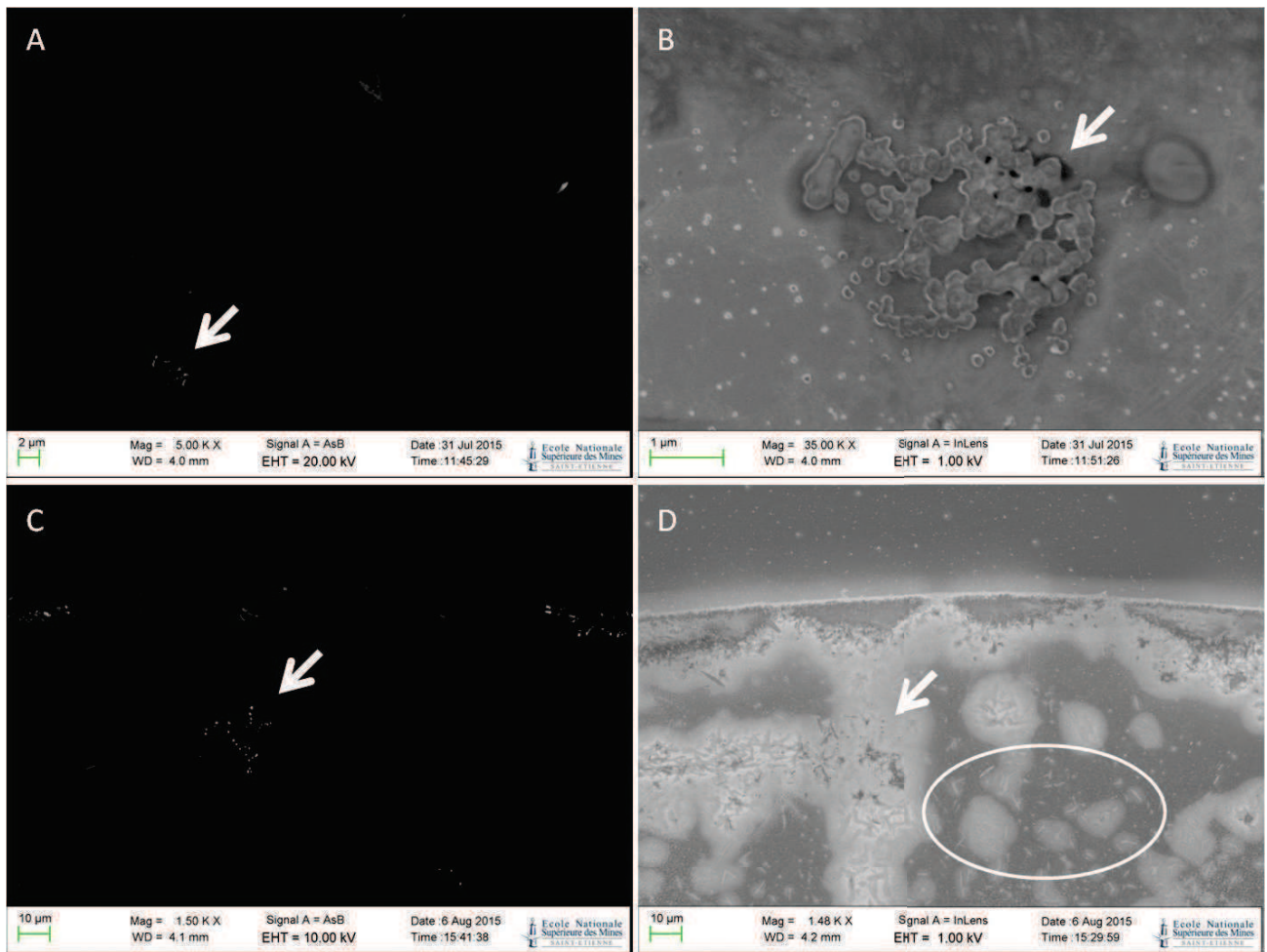
The ICPS-OES and DLS results expressed in  $\mu\text{g/mL}$  and kcps, respectively, along with their statistical analysis, can be found in Table 4.

**Table 4 : Comparison of analytical data between patients with normal sperm count and low sperm count. NS: Non Significant, ND Not Detectable**

	Patients with normal sperm count	Oligozoospermic patients	p value
Mean DLS signal (kcps)	6309 (+/- 5691)	2094 (+/- 1711)	p = 0.0493
Mean [Si] ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.155 (+/- 0.093)	0.242 (+/- 0.152)	NS (p = 0.16)
Mean [Fe] ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.012 (+/-0.011)	0.011 (+/-0.012)	NS (p = 0.84)
Mean [Ag] ( $\mu\text{g/mL}$ )	ND	ND	
Mean [Al] ( $\mu\text{g/mL}$ )	ND	ND	
Mean [Ti] ( $\mu\text{g/mL}$ )	ND	ND	

### ***SEM analysis***

Based on the results from DLS and ICP-AES, two samples were chosen to be observed in SEM. First sample came from an azoospermic patient with a very low signal in DLS but with the highest amount of silica according to ICP-AES analysis. In-lens analysis showed very little biological material, some small cluster of what could be nanoparticles was observed (Figure 3B). Due to their relative high density in backscattering analysis (Figure 3A), we can conclude that these particles could either be non biological nanoparticles or crystalline form of electrolytes that can be found in biological samples. Unfortunately, these particles amount was too small to reach the detection threshold of Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), thus no elemental analysis could be performed to answer this question. Second sample came from a normal sperm count patient with a medium DLS signal and very low amount of silica and iron. In-lens analysis also showed little biological material, however some small crystals were observed (Figure 3D). Small clusters of dense particles have also been seen in backscattering analysis (Figure 3C).



**Figure 3: A-B: SEM observation of treated semen of an azoospermic patient (A: backscattering image, magnification x 5000, B: InLens image, magnification x 35000). C-D: SEM observation of treated semen of a normal sperm count patient (A: backscattering image, magnification x 1500, B: InLens image, magnification x 1500). White arrows show cluster of nanoparticles of unknown origin, white circle shows some small crystalline structures.**

## **Discussion**

As nanoparticles are being increasingly used in a large variety of fields over the last 20 years and especially in medicine, their detection in biological media and subsequent evaluation of their toxicity on human health has become a primary concern for the scientific community. In this study we tried to extract and detect nanoparticles from human semen, a very complex biological medium. In order to achieve this, we developed an extraction protocol of nanoparticles from within a human semen and attempted to characterize the retrieved particles with three types of complementary analyses: ICP-OES, DLS, and SEM.

To test the extraction protocol's reproducibility and efficiency, we first measured its ability to remove biological material, i.e. proteins and cells. We showed that proteins were almost eliminated from samples, however between 10 and 15% of sperm cells still remained. This is probably due to the combination of sperm being highly resistant to lysis by detergents and the presence to cellular debris, which fails to migrate well during the relevant centrifugation steps. These remaining biological bodies turned out to give rise to an important signal during DLS measurement, as proven by the significant correlation between sperm count and DLS signal from patients.

Additionally, we evaluated the ability of the proposed methodology to quantitatively extract the added Au nanoparticles from the pooled semen sample. We saw that for this specific type of Au particles, the extraction yield was near-quantitative. Additional experiments showed that for other particles the method was not as efficient (data not shown). We expected that the densest and citrate-coated nanoparticles would be quantitatively extracted even at the low ppm range. However, this was not the case, as 40nm, citrate coated, Ag nanoparticles were one of the less well retrieved with the extraction protocol. At the same time, we noticed that the majority of nanoparticles were lost after the first, mild centrifugation step, during which an important amount of sperm cells is expelled from the semen (data not shown). In corroboration, FESEM images show Au nanoparticles preferentially gathered on and around sperm cells and organic debris. Therefore, it is safe to assume that the nanoparticles extraction capacity of the methodology strongly depends on their to interact to adsorb to the cellular surface. Indeed, it has already been shown that some nanoparticles were able to bind to sperm cells and that these interactions may vary depending on nanoparticles' structure, composition, surface functionalization and liquid

medium composition (Ben-David Makhluf et al., 2006; Taylor et al., 2014; Tiedemann et al., 2014). Jallouk et al., following a similar type of extraction procedure, showed that these nanoparticles-sperm interactions were able to change the nanoparticles propensity to travel within density gradients (Jallouk et al., 2014).

Considering the comparison between the two groups of patients - and despite DLS results influenced by the presence of residual biological noise - no aluminium, silver or titanium particles were found in any of studied patients' semen. This is either because there was none of these particles in patients' semen or because the followed method lacked the necessary detection sensitivity. More particularly, while still being fairly low, the limit of detection of the technique is risen by both the low yield of the extraction procedure for particles of such composition (19% for silver and 35% for titanium particles) as well as by the low volume of sample that necessitated a high analytical dilution (1/14).

A very low amount of iron was retrieved from both groups of patients and most of it probably came from sperm, it being an abundant endogenous element. Indeed, even if the correlation between iron concentration and sperm count was not significant ( $p = 0.1140$ ) there was still a trend. Moreover, a significant correlation was found between iron concentration and DLS signal that was itself correlated with sperm count. Therefore, as it has been shown that sperm contains a fairly high amount of iron especially in its mitochondria (Hales, 2010; Santambrogio et al., 2007), it is reasonable to conclude that iron that was measured with ICP-OES came mostly from sperm and did not possess a pathological capacity.

Conversely to other elements, we found a fairly high amount of silica nanoparticles. Our extraction procedure expels the soluble, i.e. ionic, fraction of semen. On this basis, we can conclude that the measured silica concentrations from ICP-OES correspond to particulates present in the semen. Despite the lack of a significant difference between the two groups of patients, there is still a visible trend of a higher content of silica nanoparticles in semen of oligozoospermic patients compared to patients with normal sperm count. With only 18 patients studied, we can hypothesize that the epidemiological power of our study is too low to establish a link between silica nanoparticles and oligozoospermia in men. At the same time, only few studies have been performed on the impact of silica nanoparticles on spermatogenesis. Moroshita et al. showed that after intravenous injection of 70nm silica nanoparticles in mice there was no

histological alteration of testes, still some particles were observed in spermatocytes and Sertoli cells (Morishita et al., 2012). In a previous study we did not observe neither histological alteration nor testicular biodistribution of core-shell 70nm gold-silica nanoparticles after intramuscular injection in mice (Leclerc et al., 2015). Finally Xu et al. observed only a transitory effect, showing that silica nanoparticles could impair spermatogenesis for about a whole spermatogenesis period, but their toxicity would eventually be reversible (Xu et al., 2014). Overall, the relevant literature does not really support the hypothetical impact of silica nanoparticles on sperm count, nevertheless more studies should be performed to clarify this point, especially given the omnipresence of silica nanoparticles in many already commercialized products.

Scanning electron microscopy analysis of treated semen of two patients showed some small clusters of nanoparticles in both of them. Due to the small size of these clusters, EDX analysis was not possible, so we were not able to determine if these particles could correspond to the silica particles retrieved in ICP-OES.

One specific compromise of this study is that, for technical reasons, we only evaluated the nanoparticle population in seminal fluid rather than in whole semen. Yet, seminal fluid is mostly secreted by prostate and seminal vesicles and meets with sperm only during the ejaculation. Logically, nanoparticles in seminal fluid should not directly impact sperm count. However, the nanoparticle load of seminal fluid can still function as a marker of individual exposure to nanoparticles and could be this way correlated to sperm count.

In conclusion, the developed extraction procedure was able to retrieve Au nanoparticles with a satisfactory yield at a low-ppm concentration. It also enabled the electron microscopy analysis of these nanoparticles in a heavily complex biological fluid. However, probable interactions between sperm and nanoparticles lowered the extraction yield for other particles. Moreover, our inability to completely eliminate sperm cells in the studied fraction convolutes the analysis of DLS. That said, we were still able to detect a small quantity of silica nanoparticles in both low and normal sperm count patients and we were also able to see some small cluster of particles in electron microscopy in both groups of patients. Globally, we were able to show that there were only few nanoparticles in human semen and that these particles are not significantly linked with oligozoospermia, at least in the studied cohort. However this is only a preliminary study and



more clinical studies of this type should be performed to reach safer conclusion regarding the effects of nanoparticles in human semen quality.

### **Acknowledgments**

The authors want to acknowledge Association AIRE for their support.

## **References**

- Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W.J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., Brunborg, G., 2012. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 291, 65–72. doi:10.1016/j.tox.2011.10.022
- ASTM International, 2013. Standard Practice for Retrieval and Analysis of Medical Devices, and Associated Tissues and Fluids.
- Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F., Jouannet, P., 1995. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.* 332, 281–285. doi:10.1056/NEJM199502023320501
- Bai, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Mu, Q., Zhang, W., Butch, E.R., Snyder, S.E., Yan, B., 2010. Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. *Nat. Nanotechnol.* 5, 683–689. doi:10.1038/nnano.2010.153
- Ben-David Makhlef, S., Qasem, R., Rubinstein, S., Gedanken, A., Breitbart, H., 2006. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 22, 9480–9482. doi:10.1021/la061988z
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J., Hofmann, M.-C., 2005. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 88, 412–419. doi:10.1093/toxsci/kfi256
- Braydich-Stolle, L.K., Lucas, B., Schrand, A., Murdock, R.C., Lee, T., Schlager, J.J., Hussain, S.M., Hofmann, M.-C., 2010. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 116, 577–589. doi:10.1093/toxsci/kfq148
- Colborn, T., Carroll, L.E., 2007. Pesticides, Sexual Development, Reproduction, and Fertility: Current Perspective and Future Direction. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 13, 1078–1110. doi:10.1080/10807030701506405
- de Mouzon, J., Thonneau, P., Spira, A., Multigner, L., 1996. Declining sperm count. Semen quality has declined among men born in France since 1950. *BMJ* 313, 43–45.
- Gaffet, E., 2011. Nanomatériaux : Une revue des définitions, des applications et des effets sur la santé. Comment implémenter un développement sûr. *Comptes Rendus - Phys.* 12, 648–658.
- Garcia, T.X., Costa, G.M.J., França, L.R., Hofmann, M.-C., 2014. Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 45, 59–70. doi:10.1016/j.reprotox.2014.01.006
- Geoffroy-Siraudin, C., Loundou, A.D., Romain, F., Achard, V., Courbière, B., Perrard, M.-H., Durand, P., Guichaoua, M.-R., 2012. Decline of semen quality among 10 932 males consulting for couple infertility over a 20-year period in Marseille, France. *Asian J. Androl.* 14, 584–590. doi:10.1038/aja.2011.173
- Gromadzka-Ostrowska, J., Dziendzikowska, K., Lankoff, A., Dobrzyńska, M., Instanes, C., Brunborg, G., Gajowik, A., Radzikowska, J., Wojewódzka, M., Kruszewski, M., 2012. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol. Lett.* 214, 251–258. doi:10.1016/j.toxlet.2012.08.028
- Hales, K.G., 2010. Iron testes: sperm mitochondria as a context for dissecting iron metabolism. *BMC Biol.* 8, 79. doi:10.1186/1741-7007-8-79

- International Organization for Standardization (Ed.), 2008. ISO/TS 27687:2008 Nanotechnologies -- Terminology and definitions for nano-objects -- Nanoparticle, nanofibre and nanoplate ICS: 07.030; 01.040.07.
- ISO, 2011. 17853:2011 Wear of implant materials -- Polymer and metal wear particles -- Isolation and characterization.
- Jallouk, A.P., Moley, K.H., Omurtag, K., Hu, G., Lanza, G.M., Wickline, S.A., Hood, J.L., 2014. Nanoparticle incorporation of melittin reduces sperm and vaginal epithelium cytotoxicity. *PloS One* 9, e95411. doi:10.1371/journal.pone.0095411
- Jensen, M.S., Mabeck, L.M., Toft, G., Thulstrup, A.M., Bonde, J.P., 2005. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 20, 2559–2566. doi:10.1093/humrep/dei110
- Jia, F., Sun, Z., Yan, X., Zhou, B., Wang, J., 2014. Effect of pubertal nano-TiO<sub>2</sub> exposure on testosterone synthesis and spermatogenesis in mice. *Arch. Toxicol.* 88, 781–788. doi:10.1007/s00204-013-1167-5
- Kreyling, W.G., Hirn, S., Möller, W., Schleh, C., Wenk, A., Celik, G., Lipka, J., Schäffler, M., Haberl, N., Johnston, B.D., Sperling, R., Schmid, G., Simon, U., Parak, W.J., Semmler-Behnke, M., 2014. Air-Blood-Barrier Translocation of Tracheally Instilled Gold Nanoparticles Inversely Depends on Particle Size. *ACS Nano* 8, 222–233. doi:10.1021/nn403256v
- Leclerc, L., Klein, J.-P., Forest, V., Boudard, D., Martini, M., Pourchez, J., Blanchin, M.-G., Cottier, M., 2015. Testicular biodistribution of silica-gold nanoparticles after intramuscular injection in mice. *Biomed. Microdevices* 17, 66. doi:10.1007/s10544-015-9968-3
- Morishita, Y., Yoshioka, Y., Satoh, H., Nojiri, N., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Tsunoda, S., Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Tsutsumi, Y., 2012. Distribution and histologic effects of intravenously administered amorphous nanosilica particles in the testes of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 297–301. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.153
- Rolland, M., Le Moal, J., Wagner, V., Royère, D., De Mouzon, J., 2013. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 28, 462–470. doi:10.1093/humrep/des415
- Santambrogio, P., Biasiotto, G., Sanvito, F., Olivieri, S., Arosio, P., Levi, S., 2007. Mitochondrial Ferritin Expression in Adult Mouse Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 1129–1137. doi:10.1369/jhc.7A7273.2007
- Swan, S.H., Elkin, E.P., Fenster, L., 1997. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ. Health Perspect.* 105, 1228–1232.
- Taylor, U., Barchanski, A., Petersen, S., Kues, W.A., Baulain, U., Gamrad, L., Sajti, L., Barcikowski, S., Rath, D., 2014. Gold nanoparticles interfere with sperm functionality by membrane adsorption without penetration. *Nanotoxicology* 8 Suppl 1, 118–127. doi:10.3109/17435390.2013.859321
- Tiedemann, D., Taylor, U., Rehbock, C., Jakobi, J., Klein, S., Kues, W.A., Barcikowski, S., Rath, D., 2014. Reprotoxicity of gold, silver, and gold-silver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *The Analyst* 139, 931–942. doi:10.1039/c3an01463k
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., Schué, F., 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* 1. doi:10.1351/PAC-REC-10-12-04

- Wang, Z., Chen, Z., Zuo, Q., Song, F., Wu, D., Cheng, W., Fan, W., 2013. Reproductive toxicity in adult male rats following intra-articular injection of cobalt-chromium nanoparticles. *J. Orthop. Sci. Off. J. Jpn. Orthop. Assoc.* 18, 1020–1026. doi:10.1007/s00776-013-0458-2
- WHO, 2010. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, Fifth Edition.
- Xu, Y., Wang, N., Yu, Y., Li, Y., Li, Y.-B., Yu, Y.-B., Zhou, X.-Q., Sun, Z.-W., 2014. Exposure to silica nanoparticles causes reversible damage of the spermatogenic process in mice. *PloS One* 9, e101572. doi:10.1371/journal.pone.0101572
- Yoshida, S., Hiyoshi, K., Ichinose, T., Takano, H., Oshio, S., Sugawara, I., Takeda, K., Shibamoto, T., 2009. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *Int. J. Androl.* 32, 337–342. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00865.x

## **8.2 CHARGE ALUMINIQUE DU SPERME HUMAIN : IMPACT SUR LES PARAMETRES SPERMATIQUES**

L'objectif de ce travail était de mesurer la quantité d'aluminium dans le sperme de patients consultants dans l'unité de Biologie de la Reproduction du CHU de Saint-Etienne, puis de rechercher un lien entre les caractéristiques spermatiques de ces patients et la quantité d'aluminium détectée.

Ce travail a bénéficié d'une collaboration avec l'équipe du Pr Exley de l'université de Keele en Grande-Bretagne. Le Pr Exley est réputé pour avoir publié de nombreux articles de qualité sur la toxicité de l'aluminium notamment sur son implication potentielle dans la maladie d'Alzheimer. Dans ce travail, le Pr Exley a réalisé l'ensemble des dosages de l'aluminium dans le sperme ainsi que les marquages au Lumogallion.

L'étude a montré qu'il y avait une quantité importante d'aluminium dans le sperme de certains de nos patients comparativement aux valeurs habituellement retrouvées dans d'autres liquides biologiques d'origine humaine<sup>167</sup>. Cette quantité ne semblait pas liée à la profession des patients, de même aucun lien n'a été retrouvé avec leur consommation de tabac. De plus, les patients présentant une oligozoospermie avait une concentration spermatique en aluminium supérieure aux autres patients. Enfin les marquages au Lumogallion ont montré la présence d'aluminium dans la tête des spermatozoïdes.



# Aluminum content of human semen: Implications for semen quality



J.P. Klein<sup>a,b,\*</sup>, M. Mold<sup>c</sup>, L. Mery<sup>a,b</sup>, M. Cottier<sup>a,b</sup>, C. Exley<sup>c,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, EA 4624, SFR IFRESIS, France

<sup>b</sup> Université Jean Monnet and CHU de Saint-Etienne, France

<sup>c</sup> The Birchall Centre, Lennard Jones Laboratories, Keele University, Staffordshire ST5 5BG, UK

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 13 April 2014

Received in revised form

17 September 2014

Accepted 1 October 2014

Available online 14 October 2014

### Keywords:

Male infertility

Aluminum

Environmental effects

Sperm analysis

## ABSTRACT

A deterioration of human semen quality has been observed over recent decades. A possible explanation could be an increased exposure to environmental pollutants, including aluminum. Our aim was to measure the aluminum concentration in the semen of 62 patients and to carry out a preliminary evaluation on its impact on specific semen parameters.

For each patient, semen analyses were performed according to WHO guidelines. A graphite furnace atomic absorption spectrometry method was used to determine semen aluminum concentration. A cytological analysis using an aluminum-specific fluor, lumogallion, was also performed.

The mean aluminum concentration in human semen was 339 µg/L. Patients with oligozoospermia had a statistically higher aluminum concentration than others. No significant difference was observed for other semen parameters. Cytological analysis showed the presence of aluminum in spermatozoa.

This study provided unequivocal evidence of high concentrations of aluminum in human semen and suggested possible implications for spermatogenesis and sperm count.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Concerns have been raised about the deterioration of human semen parameters, especially sperm count [1]. In France, despite some regional differences, most major studies indicate a steady, nation-wide decline in sperm count since 1973 [2–5]. Most authors attribute this phenomenon to environmental factors, such as endocrine disruptors [6,7].

Another environmental factor that could potentially affect semen parameters is the metal, aluminum (Al). Human exposure to Al has increased almost exponentially over the past 125 years and has become a burgeoning problem of the 21st century [8]. Al has been detected in various biological fluids such as urine [9], cerebrospinal fluid [10], sweat [11] and semen [12]. Al is a known pro-oxidative, excitotoxic, immunogenic, pro-inflammatory and mutagenic agent [8].

Food is one source of exposure to Al through preservatives or contamination from cooking and cookware. Whilst the mean intake of Al is usually below 20 mg/day, it can be much higher depending on diet [13]. WHO recommendations for food exposure were revised in 2008 from 7 mg/kg/day to 1 mg/kg/day. Al exposure can also come from the air we breathe, which in clean areas is around 1.4 µg/day, but this value can rise up to a thousand times in polluted areas or for smokers [14]. Water contamination by Al is usually under the WHO recommendations however this value can increase significantly in cities using Al as a coagulant for water treatment [15]. Al is also found in topically applied cosmetics, especially antiperspirant. A study has highlighted the ability of Al chloride to pass through the skin in significant quantities [16] and in France, the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) has issued a recommendation to limit Al chloride in antiperspirant to a maximum of 2% [17]. Finally, Al can also be present in many pharmaceuticals such as antacid and buffered aspirin, which can raise Al ingestion to several grams on a daily basis. In vaccination and allergy treatment, up to a milligram of Al can be injected along with an antigen or allergen [18,19]. Due to this wide variety of sources, it is difficult to accurately evaluate Al exposure since it may vary a lot from one individual to another depending on their working environment or life habits.

Numerous studies have been carried out to evaluate the impact of Al on the male reproductive system, most of which were

\* Corresponding author at: Hôpital Nord, CHU de Saint-Etienne, F-42055 Saint-Etienne Cedex 2, France. Tel.: +33 4 77 82 83 07; fax: +04 77 82 87 84.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jeanphiklein@hotmail.fr](mailto:jeanphiklein@hotmail.fr) (J.P. Klein), [m.j.mold@keele.ac.uk](mailto:m.j.mold@keele.ac.uk) (M. Mold), [lionel.mery@chu-st-etienne.fr](mailto:lionel.mery@chu-st-etienne.fr) (L. Mery), [michele.cottier@univ-st-etienne.fr](mailto:michele.cottier@univ-st-etienne.fr) (M. Cottier), [c.exley@keele.ac.uk](mailto:c.exley@keele.ac.uk) (C. Exley).



performed using animal models. It was shown that a 26-week oral exposure to 75 mg/kg/day of elemental Al in the form of sodium aluminum phosphate can reduce the weight of the testes in dogs [20]. Al can also induce histological anomalies such as tubular necrosis [21,22] and reductions in the thickness of seminiferous tubules [23,24] in mice and rats with various routes of exposure, chemical forms or Al concentration (intra venous Al chloride at 13 mg/kg/day for 2 weeks, intra peritoneal Al nitrate at 100 mg/kg/day for 20 days, oral Al chloride at 2.5 mg/kg/day for 6 months or *de novo* Al compounds at 6.5 mg/kg/day for 60 days). Al was also found to affect semen quality criteria depending upon the conditions being studied. For example, Yousef et al. found that after an oral administration of Al chloride at 34 mg/kg/day for 70 days in rat, all the semen parameters were altered [25]. According to them, this toxicity is likely to be due to the pro-oxidant effect of Al as co-administration of propolis, which has strong antioxidant properties, reversed the effect of Al on semen parameters. Llobet et al. showed that after intra peritoneal injection of Al nitrate at 200 mg/kg/day for 20 days in mice the epididymis sperm count was lowered while sperm mobility and morphology were not affected [22]. However Krasovskii et al. and Sharma et al. found that after oral administration of Al chloride at 2.5 mg/kg/day for 6 months in mice or *de novo* Al compounds at 6.5 mg/kg/day for 60 days in rats, respectively, both the sperm count and sperm mobility were lowered [23,24]. D'Souza et al. recently showed that after a single intra peritoneal injection of Al acetate at 100 mg/kg in Swiss albino mice, the sperm count was lowered and the percentage of abnormal spermatozoa was increased [26]. In contrast, another recent study [27] found no toxic impact of Al on semen parameters after oral exposure to Al ammonium sulfate for 10 weeks at doses up to 36.3 mg/kg/day. There have been several suggestions as to the mechanisms of toxicity of Al to the male reproductive system. In particular mechanisms involving reactive oxygen species and oxidative damage [28] have been highlighted as well as endocrine disruption of testosterone production, androgen receptor expression and libido decrease [29].

Despite these findings, data on Al load in human semen are lacking as are studies pertaining to the effects of Al on semen quality. Hovatta et al. [12] measured significant amounts of Al in semen and showed effects on sperm motility and morphology but not sperm count. Dawson et al. [30] also found significant amounts of Al in seminal plasma with higher values in the lower sperm mobility group, however there have been no other recent studies on Al in human semen and its impact upon semen quality criteria. Herein we measured the Al concentration in semen from 62 individuals and compared it to available clinical data and four semen parameters: sperm count, progressive motility, vitality and morphology.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Study population

Sixty-two male patients were recruited through the Saint-Etienne Reproductive Center (France) where they had sought medical consultation regarding their fertility. Clinical information of age, smoking habits and parenthood were also collected. Semen samples were collected by masturbation after 3–5 days of sexual abstinence.

### 2.2. Ethical approval

In accordance with French legislation, patients were informed about the purpose of the study and were asked for their consent.

The study was approved by the ethical committee of Saint-Etienne University Hospital (France).

### 2.3. Semen analysis

Semen analyses were carried out according to World Health Organization guidelines [31]. Normozoospermia was evaluated on the basis of four criteria, with pathological values being defined according to WHO reference [32]: total sperm number (<39 million per ejaculate), progressive motility (<32%) and vitality (<58% live). Sperm morphology was analyzed according to the modified classification of David (<15% of normal spermatozoa) [33].

### 2.4. Aluminum analysis

Samples of whole semen were transported to Keele University on dry ice and thereafter maintained frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until required. After thawing, samples were thoroughly mixed by vortexing and 0.5 mL volumes of whole semen were removed and added to an acid-washed digest tube. Samples were digested in a 50:50 mixture of 15.8 M  $\text{HNO}_3$  and 30% (w/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  using a microwave oven and an established tissue digest program [34]. Following digestion samples were made up to a total volume of 2.5 mL with ultrapure water (conductivity  $<0.067\ \mu\text{S}/\text{cm}$ ) and transferred to Bijoux tubes for storage. The Al content of each sample was then measured by TH GFAAS (Transversely Heated Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) using an established method [34]. This method has recently been fully verified and validated against a range of available reference materials and additional quality assurance data. As part of this we have measured 174 method blanks and obtained a median Al content of 22 ng/digestion vessel. As part of our continuing pursuit of rigor in taking account of possible contamination of Al measurements we used this value to compute a method blank of 54 ng/digestion vessel (mean + 1.654 SD). This value was subtracted from all analyses of Al in semen digests. This method is applicable to all acid/peroxide digests of living tissues and we believe is the most rigorous in the terms of taking account of contamination of samples during the processes used in measurement.

### 2.5. Histology

#### 2.5.1. Pre-embedding sperm cells into agar

Paraformaldehyde (PFA) was from Koch-Light Laboratories, UK and all other chemicals were from Sigma Aldrich, UK, unless otherwise stated. Sperm cells were thawed (from  $-20^{\circ}\text{C}$ ) and fixed by re-suspending in fresh 4% PIPES-buffered PFA (4%, w/v PFA, 150 mM NaCl, 25 mM PIPES, pH 7.4) for 24 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . Following fixation cells were pelleted *via* centrifugation for 8 min at  $8000 \times g$  (these centrifuge settings were used throughout) and washed three times by re-suspension in a PIPES-based buffer (150 mM NaCl, 50 mM PIPES, pH 7.4). Cells were transferred into a BEEM<sup>®</sup> capsule (Agar Scientific, UK) into which molten agar was added to prepare 3% (w/v) agar cell blocks.

#### 2.5.2. Dehydration and clearing of agar-cell blocks

Agar-cell blocks were transferred through a graded ethanol series from 30% to 100% (v/v) ethanol (HPLC grade) with 20 min allowed in each ethanol concentration. Agar-cell blocks were then cleared by transferring the blocks into 1.0 mL of Histo-Clear (National Diagnostics, USA) for 20 min, with one change of fresh Histo-Clear half way through.

#### 2.5.3. Infiltration and embedding of agar-cell blocks

Cleared agar-cell blocks were infiltrated in melted paraffin at  $60^{\circ}\text{C}$  in stainless steel histology embedding molds for 35–40 min. Once infiltrated, the agar-cell blocks were transferred into smaller

stainless steel histology embedding molds. An embedding cassette was placed over the mold and the whole assembly transferred onto ice for rapid cooling of the wax thereby minimizing imperfections in the final block. The embedded blocks were set fully at 4 °C overnight.

2.5.4. Microtomy

Paraffin-embedded agar-cell blocks were sectioned by use of a Leica RM2025 rotary microtome fitted with Leica 819 low profile microtomy blades (Leica Biosystems, GmbH, Germany) at a thickness of 1 µm. Paraffin sections were floated out on ultrapure water at 50 °C by use of a paraffin floatation bath for 30 s. Sections on glass slides were dried fully overnight at ambient temperature.

2.5.5. Lumogallion staining

Lumogallion staining was performed using methods described elsewhere [35]. Briefly, Re-hydrated cell sections were immediately placed into either 100 µM lumogallion (TCI Europe N.V. Belgium) buffered in 50 mM PIPES, pH 7.4 or the PIPES-buffer alone for auto-fluorescence analyses for 24 h. Slides were rinsed in ultrapure water for 2 min, air dried and finally mounted using ProLong® Gold Antifade Reagent with 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, UK).

2.5.6. Microscopy

DAPI-mounted agar-sperm cell sections were viewed using an Olympus BX50 fluorescence microscope. For DAPI imaging, a U-MWU2 fluorescence filter cube was used (bandpass excitation filter (BP): 300–385 nm, dichromatic mirror (DM): 400 nm, long-pass emission filter (LP): 420 nm) and for lumogallion imaging a U-MNIB3 fluorescence filter cube was used (BP: 470–495 nm, DM: 505 nm, LP: 510 nm) (both from Olympus, UK). All images were obtained at 1000× magnification with low auto-fluorescence immersion oil (Olympus immersion oil type-F). Exposure settings for the lumogallion analyses were fixed at 1 s. Images were obtained on a ColorView III digital camera using the Cell D software package (both from Olympus, Soft Imaging Solutions, GmbH) and fluorescent channels were overlaid by use of Photoshop (Adobe Systems, Inc., USA).

2.6. Statistical analysis

Comparisons of mean Al concentration in semen and mean age between groups were performed using a Student's *t*-test. Normality of distribution was checked and logarithmic transformation was applied when needed. For comparison of qualitative data a Chi square test was used. Correlation coefficient was calculated between Al concentration in semen and either age or semen parameters. The criterion for statistical significance was *p* < 0.05.

3. Results

3.1. Semen quality

Thirty-three patients were characterized as normozoospermic. Twenty-nine exhibited at least one pathological sign. Among them, 12 were oligozoospermic, 14 were asthenozoospermic, 5 were necrozoospermic and 15 were teratozoospermic. For 7 patients, vitality and morphology analyses were not performed due to low sperm count (Table 1).

3.2. Patient's clinical data

The patients' mean age was 33.7 years; 28 patients were current smokers and 12 were former smokers. Fifteen patients already had

**Table 1**  
Population characteristics depending on semen analysis.

	Patients number		Mean age (years)		Tobacco (% of smoker)		Mean aluminum concentration (µg/L)		p value
	Patho	Normal	Patho	Normal	Patho	Normal	Patho	Normal	
Number (<39 M)	12	50	33.0 (29.8–36.2)	33.9 (32.5–35.2)	58	66	478.1 (231.6–724.7)	305.6 (247.4–363.8)	<b>0.0337</b>
Progressive motility (<32%)	14	48	34.0 (30.8–37.1)	33.6 (32.3–34.9)	50	69	300.7 (222.9–378.6)	350.2 (268.3–432.0)	0.5293NS
Vitality (<58%)	5	50	29.7 (25.3–34.1)	33.9 (32.6–35.3)	60	64	262.2 (146.0–378.4)	349.8 (269.9–429.6)	0.4944NS
Morphology (<15%)	15	40	31.5 (30.9–33.1)	34.3 (32.7–35.9)	60	65	365.0 (251.4–478.6)	333.1 (239.5–426.7)	0.7005NS
Global semen result	29	33	33.0 (31.4–34.6)	34.3 (32.5–36.1)	62	65	384.7 (277.6–491.7)	298.9 (217.9–379.8)	0.0555NS
Total	62		33.7 (32.5–34.9)		65		339 (274.0–404.0)		

*p* values point out a statistical difference between pathological and normal semen for this parameter (95% confidence interval for the mean). NS, non significant; Patho, pathological.

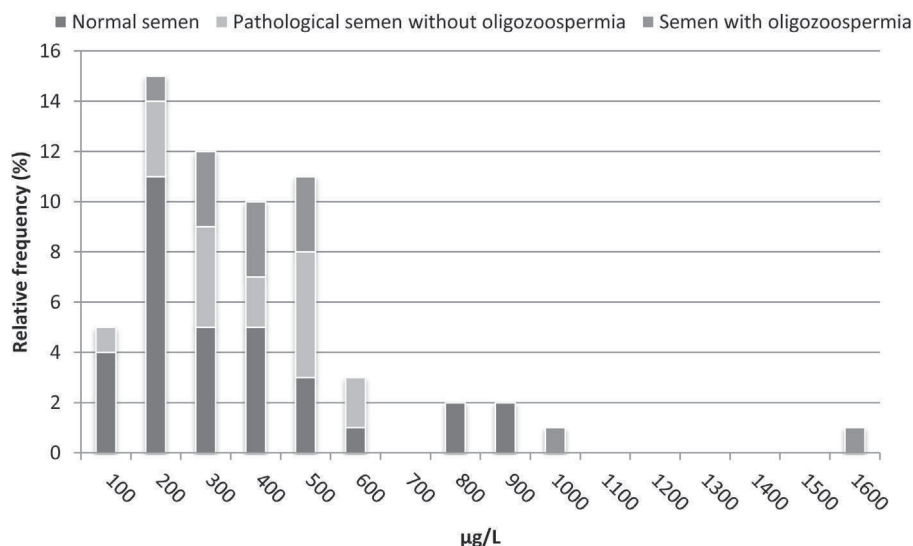


Fig. 1. Distribution of patients according to aluminum concentration in semen.

a child (one of them had two). Patient age and smoking habits were comparable between each group except that patients with teratozoospermia were slightly younger than others ( $p=0.0482$ ). This difference is not clinically relevant however one possible explanation could be that when an infertility consultation is requested by a young couple, the problem is more likely to be non-age related (for example an anomaly in sperm parameters), as is the case with older couples reporting fertility issues.

### 3.3. Aluminum concentration

The mean Al concentration was found to be  $339 \mu\text{g/L}$  (CI: 274.0–404.0) with the lowest value being  $65.8 \mu\text{g/L}$  and the highest being  $1547.8 \mu\text{g/L}$  (Fig. 1).

Patients were divided into two groups depending on their semen analysis results, normal ( $n=33$ ) or pathological ( $n=29$ ). Al concentration in semen was lower for patients with normozoospermia (Table 1) however this difference was not statistically significant ( $p=0.0555$ ). When each of the semen quality criteria (total sperm number, progressive motility, vitality and morphology) were considered separately and used to define normal and pathological groups the Al concentration in semen was found to be significantly lower for patients with oligozoospermia ( $p=0.0337$ ). This finding was also statistically significant when comparing patients with oligozoospermia and patients with normozoospermia ( $p=0.0303$ ). For progressive motility, vitality and morphology, no statistical difference was found between normal and pathological semen. Moreover, no significant correlation was found

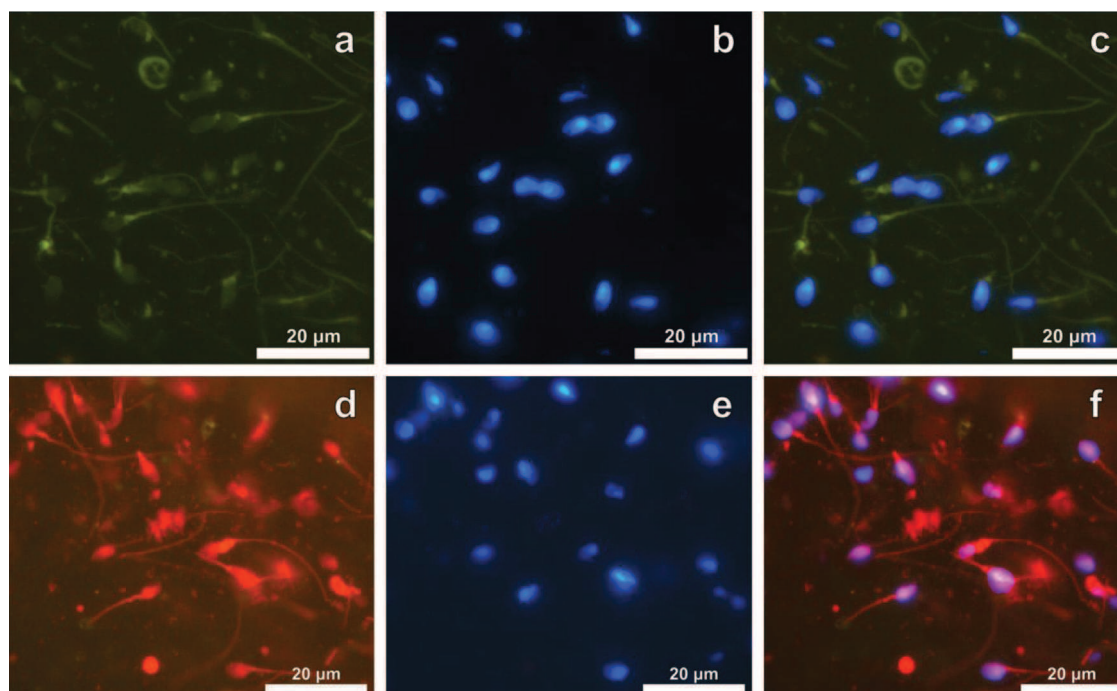


Fig. 2. Microscopic observation of  $1 \mu\text{m}$  paraffin embedded agar-sperm cell sections (magnification  $1000\times$ , scale bars:  $20 \mu\text{m}$ ). Control sections: (a) auto-fluorescence viewed under U-MNIB3 filter, (b) nuclei DAPI-staining viewed under U-MWU2 filter, (c) nuclei DAPI-staining and sperm auto-fluorescence overlay; Al lumogallion staining: (d) positive lumogallion staining viewed under U-MNIB3 filter, (e) nuclei DAPI-staining viewed under U-MWU2 filter, (f) nuclei DAPI-staining and positive lumogallion staining overlay.

between Al concentration in semen and either age or semen parameters.

Considering the patients' background, mean Al concentration in semen was not statistically different between smokers (both current and former) and non-smokers. Similarly, no statistical difference in Al concentration was found between patients who already had a child and patients who did not.

#### 3.4. Fluorescence microscopy

Using the U-MNIB3 fluorescence filter, spermatazoa showed green autofluorescence in the absence of lumogallion (Fig. 2a), while the nuclei of spermatazoa gave characteristic blue DAPI fluorescence using the U-MWU2 filter (Fig. 2b and c). Al specificity of lumogallion has already been proven in a previous work [35]. Lumogallion fluorescence identified Al associated with unidentified structures within semen and specifically with spermatazoa as evidenced by bright orange fluorescence (Fig. 2d–f).

#### 4. Discussion

Due to the ongoing deterioration of semen parameters in French men and the concomitant burgeoning exposure to Al, the aim of this study was to measure the amount of Al in semen and to compare this with established semen quality criteria.

The Al concentration in semen (mean 339  $\mu\text{g/L}$ ) was found to be high in comparison to other biological fluids. For example, mean Al concentration in serum among 44 non-exposed persons was 1.62  $\mu\text{g/L}$  [36] however the data herein are in accordance with other, if limited, observations [12]. The highest value was found for a nonsmoker and was 1547.8  $\mu\text{g/L}$ . Although tobacco is rich in Al and a potential source of Al to the body [14], we did not observe any relationship between smoking and semen Al concentration. Moreover, none of our patients reported any professional exposure to Al. As stated in the introduction, everyday life exposure to Al is very difficult to determine due to the wide range of exposure sources and time spent interacting with those sources [8].

Relating our findings about Al concentration to studies on animal models was found to be difficult since none of them performed Al analysis in semen. Only two studies from the same team analyzed Al concentration in blood and testis. The first study found a peak concentration of 700  $\mu\text{g/L}$  in blood and 140  $\mu\text{g/g}$  in testis after intra peritoneal injection of Al chloride for 2 weeks at 35 mg/kg/day of elemental Al [37]. The second study found a peak concentration of 400  $\mu\text{g/L}$  in blood and 35  $\mu\text{g/g}$  in testis after sub cutaneous injection of Al chloride for 2 weeks at 13 mg/kg/day [21]. In both studies, the Al concentration in blood and testis decreased to reach the concentration of controls after a few weeks.

Despite the relatively low number of individuals in this study, a significant increase in Al concentration was observed in the group who had a low sperm count. Conversely, we did not find any significant difference in Al concentration in semen between individuals with normal or pathological semen quality criteria for sperm progressive motility, vitality and morphology. When all quality criteria were taken together there was a higher though not statistically significant increase in Al in abnormal semen. This differs from the findings of Hovatta et al. [12] and Dawson et al. [30] who reported relationships between Al in semen and sperm motility but not with sperm count. However, the results herein are consistent with animal studies revealing impaired spermatogenesis and reduced sperm count after Al exposure [22,23]. We have used lumogallion and fluorescence microscopy to show for the first time that Al in semen is associated with both unidentified structures and specifically with spermatazoa. While we did not find any direct evidence that Al affected the immediate function of spermatazoa, Al is a

well-known mutagen [8] and we cannot discount the possibility of more subtle effects on their viability.

In conclusion, our study revealed high concentrations of Al in the semen of French men who were under consultation for fertility issues and suggested that such might have a role to play in lower sperm count. We believe that these preliminary results justify the design of a larger cohort study to identify if human Al exposure has an impact upon male fertility.

#### Funding

This work was supported by grant from Association AIRE. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

#### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

#### Acknowledgments

The authors want to acknowledge Emilie Presles for her help in statistical analysis. The authors also want to acknowledge Association AIRE for their support.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.10.001>.

#### References

- [1] Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* 1997;105:1228–32.
- [2] Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995;332:281–5, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199502023320501>.
- [3] De Mouzon J, Thonneau P, Spira A, Multigner L. Declining sperm count. Semen quality has declined among men born in France since 1950. *Br Med J* 1996;313:43–5.
- [4] Geoffroy-Siraudin C, Loundou AD, Romain F, Achard V, Courbière B, Perrard M-H, et al. Decline of semen quality among 10 932 males consulting for couple infertility over a 20-year period in Marseille, France. *Asian J Androl* 2012;14:584–90, <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2011.173>.
- [5] Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod Oxf Engl* 2013;28:462–70, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/des415>.
- [6] Perry MJ. Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2008;14:233–42, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmm039>.
- [7] Nordkap L, Joensen UN, Blomberg Jensen M, Jørgensen N. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. *Mol Cell Endocrinol* 2012;355:221–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.048>.
- [8] Exley C. Human exposure to aluminium. *Environ Sci Process Impacts* 2013;15:1807, <http://dx.doi.org/10.1039/c3em00374d>.
- [9] Davenward S, Bentham P, Wright J, Crome P, Job D, Polwart A, et al. Silicon-rich mineral water as a non-invasive test of the aluminum hypothesis in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 2013;33:423–30, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2012-121231>.
- [10] Roos PM, Vesterberg O, Syversen T, Flaten TP, Nordberg M. Metal concentrations in cerebrospinal fluid and blood plasma from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Biol Trace Elem Res* 2013;151:159–70, <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-012-9547-x>.
- [11] Genuis SJ, Birkholz D, Rodushkin I, Beeson S. Blood, urine, and sweat (BUS) study: monitoring and elimination of bioaccumulated toxic elements.



- Arch Environ Contam Toxicol 2011;61:344–57, <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-010-9611-5>.
- [12] Hovatta O, Venäläinen ER, Kuusimäki L, Heikkilä J, Hirvi T, Reima I. Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. *Hum Reprod Oxf Engl* 1998;13:115–9.
- [13] Bratakos SM, Lazou AE, Bratakos MS, Lazos ES. Aluminium in food and daily dietary intake estimate in Greece. *Food Addit Contam B: Surveill* 2012;5:33–44, <http://dx.doi.org/10.1080/19393210.2012.656289>.
- [14] Exley C, Begum A, Woolley MP, Bloor RN. Aluminium in tobacco and cannabis and smoking-related disease. *Am J Med* 2006;119, <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.08.004>. pp. 276.e9–11.
- [15] WHO. Aluminium in drinking-water. *Guidel Drink-Water Qual* 1998:2.
- [16] Pineau A, Guillard O, Favreau F, Marty M-H, Gaudin A, Vincent CM, et al. In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz™ diffusion cell. *J Inorg Biochem* 2012;110:21–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.02.013>.
- [17] AFSSAPS. Évaluation du risque lié à l'utilisation de l'aluminium dans les produits cosmétiques; 2011.
- [18] May JC, Progar JJ, Chin R. The aluminum content of biological products containing aluminum adjuvants: determination by atomic absorption spectrometry. *J Biol Stand* 1984;12:175–83.
- [19] Exley C. Aluminium adjuvants and adverse events in sub-cutaneous allergy immunotherapy. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2014;10:4, <http://dx.doi.org/10.1186/1710-1492-10-4>.
- [20] Pettersen JC, Hackett DS, Zwicker GM, Sprague GL. Twenty-six week toxicity study with KASAL® (basic sodium aluminum phosphate) in beagle dogs. *Environ Geochem Health* 1990;12:121–3, <http://dx.doi.org/10.1007/BF01734061>.
- [21] Guo C-H, Lu Y-F, Hsu G-SW. The influence of aluminum exposure on male reproduction and offspring in mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005;20:135–41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2004.11.007>.
- [22] Llobet JM, Colomina MT, Sirvent JJ, Domingo JL, Corbella J. Reproductive toxicology of aluminum in male mice. *Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol* 1995;25:45–51.
- [23] Krasovskii GN, Vasukovich LY, Chariev OG. Experimental study of biological effects of leads and aluminum following oral administration. *Environ Health Perspect* 1979;30:47–51.
- [24] Sharma S, Sharma RK, Sharma R, Sharma A, Rai AK, Gupta RS, et al. Synthesis and characterisation of some new aluminium derivatives of Schiff bases containing N, O and S donor atoms and the anti fertility activity of the derivative Al[SC6H4N:C(CH3)CH2COCH3]3. *Bioinorg Chem Appl* 2003;21:5–25, <http://dx.doi.org/10.1155/S1565363303000177>.
- [25] Yousef MI, Salama AF. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 2009;47:1168–75, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.006>.
- [26] D'Souza SP, Vijayalaxmi KK, Naik P. Assessment of genotoxicity of aluminium acetate in bone marrow, male germ cells and fetal liver cells of Swiss albino mice. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014;766:16–22, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.02.006>.
- [27] Hirata-Koizumi M, Fujii S, Ono A, Hirose A, Imai T, Ogawa K, et al. Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of aluminium ammonium sulfate in a two-generation study in rats. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 2011;49:1948–59, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.035>.
- [28] Guo C-H, Huang C-J, Chiou Y-L, Hsu G-SW. Alteration of trace element distribution and testis ACE activity in mice with high peritoneal aluminum. *Biol Trace Elem Res* 2002;86:145–57, <http://dx.doi.org/10.1385/BTER:86:2:145>.
- [29] Sun H, Hu C, Jia L, Zhu Y, Zhao H, Shao B, et al. Effects of aluminum exposure on serum sex hormones and androgen receptor expression in male rats. *Biol Trace Elem Res* 2011;144:1050–8, <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-011-9098-6>.
- [30] Dawson EB, Ritter S, Harris WA, Evans DR, Powell LC. Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels. *Biol Trace Elem Res* 1998;64:215–9, <http://dx.doi.org/10.1007/BF02783337>.
- [31] WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed; 2010.
- [32] Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010;16:231–45, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmp048>.
- [33] Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl* 1988;11:379–94.
- [34] House E, Esiri M, Forster G, Ince PG, Exley C. Aluminium, iron and copper in human brain tissues donated to the Medical Research Council's Cognitive Function and Ageing Study. *Metallomics* 2012;4:56–65, <http://dx.doi.org/10.1039/c1mt00139f>.
- [35] Mold M, Eriksson H, Siesjö P, Darabi A, Shardlow E, Exley C. Unequivocal identification of intracellular aluminium adjuvant in a monocytic THP-1 cell line. *Sci Rep* 2014;4, <http://dx.doi.org/10.1038/srep06287>.
- [36] Valkonen S, Aitio A. Analysis of aluminium in serum and urine for the biomonitoring of occupational exposure. *Sci Total Environ* 1997;199:103–10.
- [37] Guo C-H, Huang C-J, Chen S-T, Wang Hsu G-S. Serum and testicular testosterone and nitric oxide products in aluminum-treated mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001;10:53–60.

---

## DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



## 9 DISCUSSION

### 9.1 SYNTHÈSE DES RESULTATS ET DE LA LITTÉRATURE

#### 9.1.1 IMPACT DES NANOMATERIAUX SUR LA FONCTION DE REPRODUCTION MASCULINE

Concernant les nanomatériaux, les résultats de nos études semblent plutôt rassurants. Ainsi lors de notre première étude sur des particules de latex de 450 nm injectées par voie intramusculaire chez la souris, nous avons montré que les particules étaient bel et bien capables d'atteindre le testicule mais qu'elles le faisaient en très petite quantité ( $1/10^7$ ) au regard du volume qu'occupent les testicules chez la souris (1%). Ce résultat est confirmé par notre seconde étude, très similaire à la première, mais qui utilisait cette fois des particules plus petites (70 nm) et de chimie différente (silice). Là encore une distribution inexistante ou du moins très faible ( $<1/10^5$ ) des nanoparticules vers le testicule était retrouvé. En outre, l'analyse histologique des prélèvements ne retrouvait aucune altération majeure du tissu testiculaire. Ces résultats rassurants sur les études animales sont complétés par des résultats rassurants chez l'homme puisque les 18 patients inclus dans notre troisième étude ne présentaient pas une charge particulaire importante dans leur sperme et aucun lien n'a été observé entre cette charge particulaire et une éventuelle oligozoospermie. Toutefois, l'observation d'images de particules non identifiées en microscopie électronique à balayage, aussi bien chez un patient oligozoosperme que chez un patient présentant un nombre normal de spermatozoïdes, nous amènera à poursuivre nos investigations.

Il est intéressant de noter que ce discours rassurant va à l'encontre de ce qui est en général observé dans les études publiées dans la littérature qui ont au contraire tendance à mettre en avant la reprotoxicité potentielle des nanoparticules. Les premières explications de cette différence sont des explications scientifiques. En effet, concernant les études animales nous avons étudiées une voie d'exposition qui ne l'avait jamais été jusque là dans les études s'intéressant à la biodistribution testiculaire des particules, à savoir la voie intramusculaire. Or nous avons vu précédemment que la voie d'exposition était très probablement un facteur déterminant pouvant expliquer des différences de distribution testiculaire des particules. De même, les caractéristiques physicochimiques et notamment la taille des particules que nous avons étudié étaient différentes de celles utilisées dans la majorité des autres travaux. Concernant les études cliniques, les comparaisons avec la littérature sont impossibles puisqu'à notre connaissance aucune autre étude clinique n'a été publiée sur le sujet.

Toutefois l'analyse détaillée de la littérature effectuée dans cet ouvrage nous permet d'aller au-delà de ces constatations scientifiques et de remettre en cause les conclusions souvent préoccupantes énoncées dans certaines publications. Il est tout d'abord nécessaire de noter qu'un nombre non négligeable d'études présentent des résultats dont la fiabilité doit être sérieusement remise en question. Ceci peut être soit lié à une méthodologie inappropriée<sup>63,75,76,90,91</sup> soit à une falsification probablement volontaire des résultats afin que les conclusions de l'étude aillent dans le sens de l'hypothèse des auteurs<sup>42,43,54,64</sup>. Il est évidemment audacieux de porter de telles accusations à l'encontre des auteurs mais dans certains cas, comme pour le travail de Zhao *et al.*, le doute était suffisamment important pour pousser l'éditeur à retirer la publication du journal<sup>168</sup>. Les études de Kwon *et al.* et Kim *et al.*, menées par une même équipe, sont également de bonnes illustrations du problème posé par la publication de résultats erronés. Dans la première, les auteurs concluent qu'après inhalation de particules fluorescentes de 50 nm chez la souris, le testicule est l'un des organes cibles privilégié de la distribution des particules. Ils illustrent leur propos en montrant des images de testicule de souris témoins présentant une faible fluorescence et des images de testicule de souris exposées présentant une forte fluorescence. En observant en détail les images fournies on remarque que l'image du témoin est centrée sur un tube séminifère tandis que les images des souris exposées sont centrées sur des espaces inter-tubulaires. Or lors de notre première étude, nous avons mis en évidence une forte autofluorescence au niveau de ces régions<sup>169</sup>. Il est donc vraisemblable qu'une partie importante de la fluorescence attribuée aux particules par l'équipe de Kwon *et al.* soit en réalité de l'autofluorescence testiculaire (Figure 43).

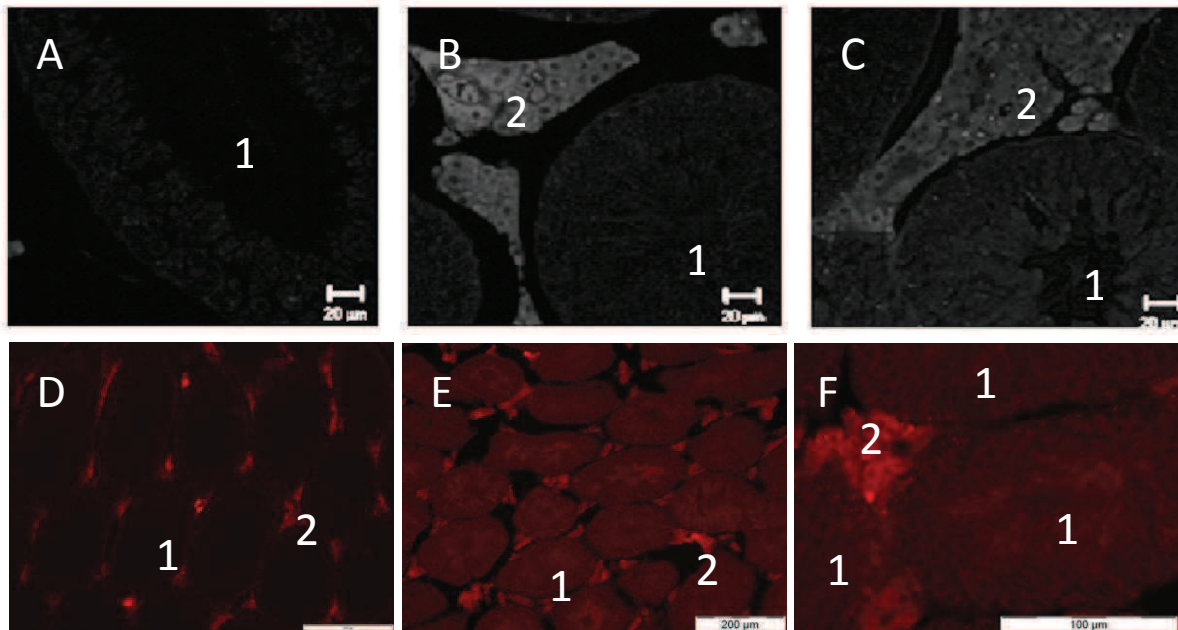


FIGURE 43 : IMAGES DE TESTICULES OBSERVES EN MICROSCOPIE CONFOCALE OU A EPIFLUORESCENCE ISSUS DES ETUDES DE KWON *ET AL.* ET DE KLEIN *ET AL.* A : TESTICULE DE SOURIS CONTROLE (KWON *ET AL.*) B-C : TESTICULES DE SOURIS EXPOSEES AUX NANOPARTICULES FLUORESCENTES (KWON *ET AL.*) D-E-F : TESTICULES DE SOURIS CONTROLES (KLEIN *ET AL.*) 1 : TUBE SEMINIFERE. 2 : ESPACE INTER-TUBULAIRE.

Dans l'étude de Kim et al. il est stipulé que les mêmes nanoparticules injectées à des souris par voie intra-péritonéale sont capables d'atteindre le testicule et de franchir la barrière hémato-testiculaire. Là encore, les images données pour confirmer les dires des auteurs sont loin d'être convaincantes. En effet lors de notre première étude nous avons montré la présence d'une forte autofluorescence adluminal dans certains tubes séminifères correspondant probablement à la tête des spermatozoïdes<sup>169</sup>. Or les images présentées par Kim et al. pour justifier de la présence de nanoparticules dans le tube séminifère, et donc pour attester du franchissement de la barrière hémato-testiculaire, sont très proches de celles que nous avons obtenues sur nos témoins négatifs du fait de cette autofluorescence (Figure 44). Même si nous ne pouvons pas être certain du caractère volontaire de telles « erreurs », elles ont des conséquences importantes sur l'avancée des connaissances à propos de la reprotoxicité des nanoparticules. En effet, pour la majorité des scientifiques ayant publié dans ce domaine, il est acquis que les nanoparticules sont capables de franchir la barrière hémato-testiculaire et l'un des articles les plus cités en référence à ces allégations est celui de Kim *et al.*<sup>66,67</sup>

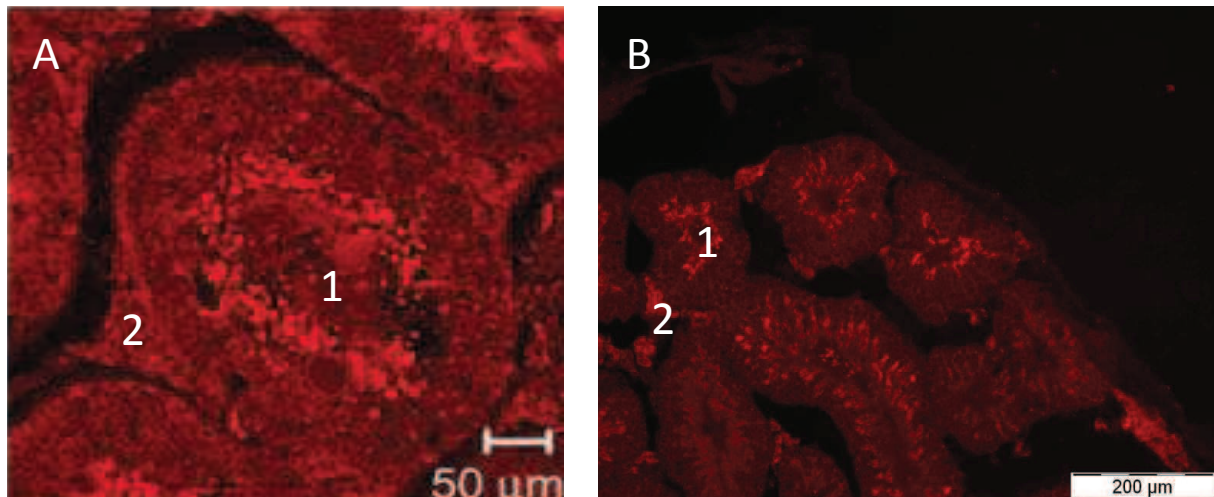


FIGURE 44 : A. COUPE D'UN TESTICULE DE SOURIS EXPOSEE A DES NANOPARTICULES FLUORESCENTES OBSERVEE EN MICROSCOPIE CONFOCALE KIM *ET AL.*<sup>59</sup> B. COUPE D'UN TESTICULE DE SOURIS CONTROLE OBSERVEE EN MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE KLEIN *ET AL.*<sup>159</sup> 1. TUBE SEMINIFERE. 2. ESPACE INTERTUBULAIRE.

Un autre point à prendre en compte dans l'analyse de la littérature est l'existence très probable d'un fort biais de publication. En effet, comme nous l'avons constaté pour notre deuxième article, il est nettement plus difficile de publier un résultat négatif car il est plus ardu de fournir suffisamment de preuves pour attester de l'absence d'une particule dans un échantillon, que de sa présence.

Enfin, pour s'assurer d'un résultat positif les équipes tendent à tester des doses de particules particulièrement élevées. Ce dernier point concerne de nombreuses études, y compris les études que nous avons réalisées. Que ce soit pour les études animales, où les doses de particules administrées reflètent rarement une exposition réaliste, ou pour les études *in vitro*, où nous avons montré que compte tenu des résultats des études animales il était peu envisageable que de telles doses atteignent les cellules testiculaires, les quantités de nanoparticules testées sont trop importantes. A la décharge des auteurs, la mesure de l'exposition aux nanomatériaux n'est pas chose aisée tant le nombre de nanomatériaux devant être pris en compte et la variété des situations d'exposition sont importants<sup>170,171</sup>, de ce fait le choix des doses dans ce type d'étude est difficile mais les auteurs devraient malgré tout adapter les doses utilisées employées dans leurs études à des expositions réalistes.

Au final, au vu de nos résultats et de ceux rapportés par la littérature que sait-on réellement aujourd'hui de la reproxicité masculine des nanomatériaux ?

- Le premier point clairement mis en évidence dans la majorité des études est la capacité des nanoparticules à se distribuer vers le testicule. Elles le font toutefois, dans la majorité des cas, en très petite quantité au regard des doses généralement utilisées. Si dans notre

seconde étude et dans l'étude de Choi *et al.*, il n'est pas retrouvé de biodistribution testiculaire des nanoparticules injectées, il s'agit probablement d'une sensibilité insuffisante des techniques de détection utilisées, en particulier de l'ICP-AES.

- Les facteurs qui semblent le plus influencer la biodistribution testiculaire des nanoparticules sont d'une part la taille des particules (toutes choses égales par ailleurs, plus une particule est petite et plus elle semble pouvoir atteindre aisément le testicule) et la voie d'exposition (les voies intraveineuses et intra-articulaires semblent favoriser la distribution testiculaire tandis que les voies orales, respiratoires et surtout intramusculaires semblent la freiner).
- Bien qu'il soit probable qu'un certain nombre de nanoparticules soient capables de franchir la barrière hémato-testiculaire, comme elles le font par exemple pour la barrière hémato-encéphalique<sup>172</sup>, seul l'étude de Morishita *et al.* fournit des éléments convaincants pour étayer cette hypothèse. Nos analyses en microscopie confocale, lors de notre première étude, ou en microscopie électronique, lors de notre seconde étude, ne nous ont pas permis d'apporter d'éléments en ce sens. Ainsi, comme le souligne l'ANSES, il est en l'état impossible de conclure au franchissement de la barrière hémato-testiculaire par les nanoparticules.
- Notre première étude et plusieurs autres ont permis de mettre en évidence une biopersistance des particules au sein du testicule. Cette biopersistance pourrait être favorisée par certaines voies d'exposition, comme la voie orale ou la voie inhalée, et surtout par la durée de cette exposition : plus elle est longue et plus les nanoparticules sont susceptibles de s'accumuler et de se maintenir sur une longue période à l'intérieur du testicule.
- La toxicité testiculaire des nanoparticules et plus particulièrement celle qui implique la fonction exocrine, c'est-à-dire la spermatogenèse, semble fortement influencée par la composition chimique des particules. Les nanoparticules d'argent ont par exemple un impact supérieur aux autres particules. Plusieurs mécanismes de cette toxicité sont évoqués sans que l'un d'entre eux puisse expliquer l'ensemble des effets observés. On retrouve notamment : une augmentation de la synthèse des radicaux libres, une augmentation de l'apoptose, une augmentation de la nécrose, une génotoxicité ou des interférences avec les voies de transduction des signaux. Cette toxicité se traduit le plus souvent par des lésions histologiques modérées et une diminution de la production des spermatozoïdes. Toutefois, dans la majorité des cas, qu'il s'agisse des études *in vitro* ou des études *in vivo*, les doses de nanoparticules nécessaires à l'observation d'une toxicité directe sont particulièrement élevées et donc peu réalistes. De plus, que ce soit pour les lésions histologiques ou l'atteinte

de la spermatogenèse, il semble que les effets des nanoparticules soient fréquemment réversibles à l'arrêt de l'exposition. Les résultats de nos études tout comme les données de la littérature sont donc rassurantes concernant cette forme potentielle de toxicité

- En revanche, l'analyse de la littérature indique clairement que les nanoparticules peuvent avoir un effet de perturbateur endocrinien. En effet, plusieurs études apportent les preuves solides d'une modification de la synthèse de testostérone en présence de certaines nanoparticules, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Dans la plupart des cas, il s'agit d'une augmentation de la synthèse dont le mécanisme est une surexpression des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse (P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ HSD1 et 17 $\beta$ -HSD) et de certains gènes de régulation (StAR). Les divergences observées dans certaines études s'expliquent probablement en partie par l'influence des caractéristiques physico-chimiques des particules. Toutefois, en faire le détail reste à l'heure actuelle assez difficile du fait d'un nombre trop restreint de travaux.
- Enfin plusieurs études se sont intéressées à la toxicité directe des nanoparticules sur les spermatozoïdes matures. Au delà du manque de pertinence d'un tel modèle, les spermatozoïdes matures ayant une faible durée de vie et étant probablement plus résistants aux agents toxiques que les autres cellules testiculaires, les études les plus sérieuses ne constatent pas de toxicité des nanoparticules. En revanche, à des concentrations suffisamment élevées, les nanoparticules se fixent sur la membrane plasmique des spermatozoïdes réduisant leur pouvoir fécondant.

En conclusion, s'il existe bel et bien une toxicité des nanomatériaux sur la fonction de reproduction masculine, celle-ci est en général observée pour des concentrations relativement élevées peu réalistes dans le cadre d'une exposition humaine. Il est malgré tout difficile de généraliser cette conclusion rassurante à l'ensemble des nano-objets tant leurs propriétés physico-chimiques sont variées, l'approche la plus adaptée est probablement de partir d'une mesure de l'exposition potentielle à chaque nano-objet est de faire une évaluation spécifique de ceux pour lesquels l'exposition est la plus importante. Le point le plus inquiétant est peut-être la capacité de certaines nanoparticules à jouer le rôle de perturbateurs endocriniens et c'est probablement cette voie de recherche qui devrait être privilégiée dans les études à venir. Par ailleurs, il existe d'importantes lacunes sur les interactions entre les nanoparticules et la barrière hémato-testiculaire, quelques études robustes sur ce sujet devrait également être menées. Enfin, un point qui n'a jusque-là jamais été étudié, et qui pourtant reflète la réalité, est l'effet d'une exposition simultanée à de multiples nanoparticules. En effet, si l'exposition à une seule nanoparticule n'a en général pas d'effet délétère



sur la fonction de reproduction, des expositions multiples pourraient potentialiser l'impact de chaque nanoparticule et contredire les conclusions rassurantes exposées ici.

### **9.1.2 IMPACT DE L'ALUMINIUM SUR LA FONCTION DE REPRODUCTION MASCULINE**

Si nos données et celles de la littérature sont dans l'ensemble plutôt rassurantes concernant la reprotoxicité des nanoparticules, le constat est tout autre concernant l'aluminium. En effet, notre étude a retrouvé une quantité d'aluminium particulièrement importante dans le sperme de nos patients, bien supérieure à ce qui a été observé dans les autres liquides de l'organisme<sup>167</sup> mais comparable aux deux autres études réalisées chez l'homme<sup>151,152</sup>. Au-delà de ce résultat déjà inquiétant en lui-même, nous avons également montré que la quantité d'aluminium était significativement plus élevée chez les patients présentant une oligozoospermie que chez les autres. Ce point doit toutefois être nuancé car notre étude a été réalisée sur un petit effectif de patients (62) et en regardant les données dans le détail, quelques patients présentant une concentration particulièrement élevée d'aluminium étaient oligozoospermes. De nouvelles études sur des effectifs plus grands doivent donc être réalisées pour confirmer ce résultat ce d'autant plus qu'il n'est pas retrouvé dans l'étude d'Hovatta *et al.* dont la construction était pourtant très similaire à la notre<sup>151</sup>. Par ailleurs, à l'aide d'un marquage spécifique, nous avons montré que l'aluminium s'accumulait dans la tête des spermatozoïdes. Ce point qui n'avait jamais été exploré jusque-là est d'autant plus inquiétant qu'il a déjà été montré que l'aluminium était génotoxique<sup>115</sup>. Là encore de nouvelles études devront confirmer ce résultat et évaluer dans quel compartiment cellulaire l'aluminium s'accumule et quel est son impact sur la fonction spermatique.

Notre étude vient ainsi compléter les études animales qui pour la plupart montrent l'existence d'un impact de celui-ci sur la fonction testiculaire, qu'elle soit endocrine ou exocrine. S'il est regrettable de constater que nombre d'entre elles sont sujettes à caution du fait de résultats anormalement conformes aux attentes des auteurs et de raisonnement scientifiques approximatifs, il existe malgré tout un petit groupe d'étude suffisamment bien construites pour que la question de la reprotoxicité de l'aluminium soit prise au sérieux. Malheureusement, malgré une exposition croissante des populations et les indices d'un impact possible sur la santé, la toxicité de l'aluminium en général et sa reprotoxicité en particulier restent insuffisamment étudiées.

## **9.2 LIMITES DE NOS TRAVAUX**

### **9.2.1 DETECTION DES NANOPARTICULES**

Les travaux que nous avons réalisés ne sont pas exempts de reproche, en particulier nos études sur les nanoparticules se heurtent à une limite technique évidente : leur détection et leur caractérisation

dans les milieux biologiques. De façon générale, les outils classiquement utilisés pour la détection des nanoparticules sont mal adaptés à nos échantillons biologiques.

La DLS est une technique très sensible aux interférences liées au bruit de fond biologique. Dans leur revue de la littérature Von der Kammer *et al.* précisent : « basic dynamic light scattering is only applicable in fairly simple, homogeneous systems, at particle concentrations typically exceeding 1 mg/L »<sup>160</sup>. Ce point semble faire consensus dans la communauté scientifique mais en l'absence de solution alternative aisément accessible elle restait le meilleur outil pour la détection rapide et la quantification des particules dans nos échantillons.

Les techniques de microscopies électroniques se heurtent essentiellement au faible volume d'échantillon pouvant être analysé et à la faible quantité de particules qui y sont attendues. En outre, la microscopie électronique à balayage peut être mise en défaut en présence d'une quantité importante de matériel biologique masquant les particules. Même si l'analyse des électrons rétrodiffusés permet en partie de pallier à ce problème, ceci se fait au prix d'une incapacité à observer les nanoparticules constituées des éléments les plus légers, invisibles dans ce mode de détection. De plus, la faible masse particulaire mise en évidence dans nos travaux rendait impossible les analyses élémentaires en microanalyse X dont la sensibilité est insuffisante. Ainsi, bien que nous ayons pu observer quelques particules en microscopie électronique, l'impossibilité de réaliser une caractérisation élémentaire limite la portée de nos résultats.

Ces difficultés techniques ne concernent pas que les particules de nature inconnue, en effet, même lorsque des particules spécifiquement marquées pour être tracées dans un prélèvement biologique sont utilisées, la faible quantité et la petite taille des particules constituent un frein à l'obtention de résultats fiables. Ainsi, lors de notre seconde étude animale nous avons utilisé des particules de 70 nm contenant de la fluorescéine et un cœur d'or leur permettant d'être observée en microscopie confocale, en microscopie électronique et en ICP-AES. Malgré ces caractéristiques, le signal émis par les nanoparticules est resté inférieur au seuil de détection de nos techniques, nous interdisant d'apporter une conclusion précise sur la proportion de particules susceptibles d'atteindre le testicule après injection intramusculaire.

S'il est aisé de faire le constat de ces limites, trouver un moyen de les dépasser est particulièrement ardu. Notre revue de la littérature montre clairement que nous ne sommes pas les seuls à y être confronté et les solutions semblent avant tout passer par le développement de nouvelles techniques d'ingénierie capables de les dépasser. Le développement de la SP-ICP-MS ou d'appareils innovants<sup>162</sup> sont un premier pas dans cette direction mais leur disponibilité reste pour l'heure insuffisante.

### 9.2.2 CONCEPTION DES ETUDES CLINIQUES

Au-delà des limites techniques évoquées ci-dessus, les études cliniques que nous avons réalisées, que ce soit sur les nanoparticules ou l'aluminium, présentent dans leur conception une triple approximation qui en diminue la portée (Figure 45) :

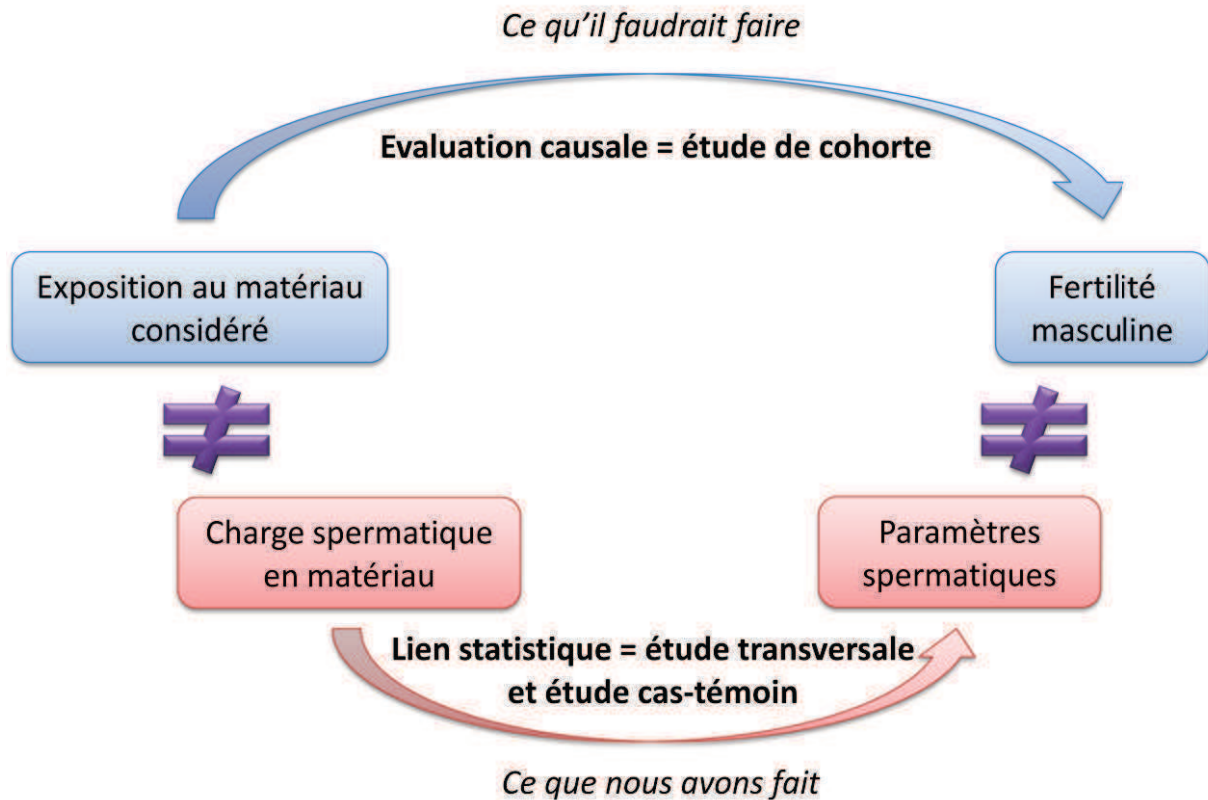


FIGURE 45 : SCHEMA RESUMANT LES LIMITES DES ETUDES CLINIQUES QUE NOUS AVONS REALISEES.

La première de ces approximations est le choix d'évaluer l'exposition au matériau considéré par une mesure de sa concentration dans le sperme humain. En effet, le sperme est composé à 95 % de plasma séminal produit pour l'essentiel dans la prostate et les vésicules séminales. De fait, si à première vue il peut sembler logique d'évaluer la présence d'un éventuel facteur toxique dans le sperme humain, cela ne présage en rien de son impact sur la spermatogenèse puisque l'essentiel de cette charge n'a pas été en contact avec le testicule. Ceci est d'autant plus vrai que, dans le cadre de notre étude sur les nanoparticules, la fraction cellulaire était retirée de l'échantillon avant analyse. En outre il n'est pas non plus certain que la quantité de matériaux excrétée par les glandes annexes soit représentative de l'exposition globale d'un individu à ce matériau, encore moins de la quantité de celui-ci qui atteint le testicule. Ainsi, il serait probablement plus pertinent d'évaluer directement cette exposition par l'intermédiaire de mesures environnementales et de questionnaires individuelles. Mais que ce soit pour les nanomatériaux ou pour l'aluminium, les sources d'exposition sont tellement variées qu'une telle évaluation s'avère très complexe à réaliser. Ainsi, nous n'avons eu

d'autres choix lors de nos travaux que de faire appel à un marqueur indirect de cette exposition malgré toutes les imperfections que comporte une telle démarche.

La seconde approximation est le choix d'évaluer la fertilité masculine par le biais des caractéristiques spermatiques. En réalité, la seule façon rigoureuse d'évaluer l'impact sur la fertilité masculine d'une substance supposée reprotoxique est de comparer des individus fertiles, c'est-à-dire capables de se reproduire, à des individus infertiles, qui n'ont pas obtenu de grossesse après un an de rapports sexuels réguliers non protégés. Ceci pose toutefois deux difficultés. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la première difficulté est qu'il est malaisé de déterminer si une personne est fertile ou infertile puisque d'une part la fertilité passée ne présage pas de la fertilité à venir (un homme ayant déjà réussi à procréer n'est pas certain de pouvoir procréer à nouveau) et d'autre part la fertilité se juge toujours au niveau d'un couple (l'origine d'une infertilité peut très bien être exclusivement féminine). La seconde difficulté se situe dans le recrutement d'individus supposés fertiles. En effet, ces derniers ne consultent pas en biologie de la reproduction pour y effectuer un prélèvement de sperme. Il serait donc nécessaire de demander à des hommes fertiles de réaliser des prélèvements spécifiquement pour nos études. Si cette option reste tout à fait envisageable, elle nécessite tout de mêmes des preuves plus déterminantes de la toxicité potentielle des matériaux étudiés dans cet ouvrage que celles dont nous disposons actuellement.

La troisième approximation est la réalisation d'études transversales (dans le cas de l'aluminium) ou cas-témoins (dans le cas des nanoparticules) sur de très petites populations. Ces choix limitent grandement la portée de nos résultats et les conclusions que nous pouvons en tirer. Néanmoins, s'agissant d'études exploratoires sur des sujets qui n'ont jusque là quasiment pas été traités dans la littérature, elles apportent des informations susceptibles d'orienter dans l'avenir des études plus ambitieuses.

### **9.3 CONCLUSIONS**

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact des nanomatériaux et de l'aluminium sur la fonction de reproduction masculine. Nous sommes dans l'ensemble plutôt rassurés en ce qui concerne les nanomatériaux. Nous avons en effet vu, lors de nos études et dans l'analyse de la littérature, que la biodistribution des nanoparticules vers le testicule, bien que dépendante d'un certain nombre de paramètres encore insuffisamment étudiés, était globalement faible. Nous avons également vu au travers de la littérature que bien qu'il existe une toxicité testiculaire des nanoparticules, celle-ci survient le plus souvent pour des doses élevées et sont régulièrement réversibles à l'arrêt de l'exposition. Il est plus inquiétant de constater que les nanoparticules ont la possibilité d'agir comme

des perturbateurs endocriniens. Enfin lors de notre étude clinique, avec toutes les limites techniques qu'elle comporte, nous avons pu constater que la charge spermatique en nanoparticules de nos patients était relativement faible et qu'elle ne semblait pas corrélée avec l'existence d'une oligozoospermie. Ainsi concernant les nanoparticules, les données que nous avons présentées semblent rassurantes. Toutefois, un certain nombre de questions (franchissement de la barrière hémato-testiculaire, perturbation endocrinienne, exposition multiples) restent en suspens. De nouvelles études devront s'atteler à franchir les limites techniques et proposer une méthodologie rigoureuse afin de répondre à ces questions.

En ce qui concerne l'aluminium, nos conclusions sont différentes. Les résultats de nos études, tout comme l'analyse de la littérature laissent entrevoir un impact négatif réel de l'aluminium sur la fonction de reproduction masculine. Malheureusement, les données existantes sont largement insuffisantes et de nouvelles études doivent impérativement être menées au vu de l'exposition croissante des populations à ce métal. Toutefois, alors même que les limites techniques évoquées pour les nanomatériaux sont bien moindre pour l'aluminium, il semble que ce sujet n'intéresse que peu la communauté scientifique, d'où l'importance de poursuivre nos travaux dans ce domaine.

### **9.4 PERSPECTIVES**

A très court terme, ce travail sera poursuivi par la rédaction d'une revue de la littérature sur l'impact des nanoparticules sur la fonction de reproduction masculine. En effet, beaucoup d'études ont été publiés ces trois dernières années et aucune revue n'a essayé d'en faire la synthèse. Or nous avons vu que les idées fausses qui circulent sur ce sujet sont nombreuses et il semble nécessaire de faire le tri entre ce qui est réellement démontré et ce qui reste de l'ordre de la spéculation.

Parallèlement nous allons également poursuivre la mise au point du protocole de détection des nanoparticules sur le sperme humain. Si nous parvenons à améliorer les résultats obtenus en DLS et à trouver un moyen de mesurer la composition élémentaire des particules observées en microscopie électronique à balayage, nous réaliserons une étude clinique sur d'avantage de patients afin d'approfondir nos premiers résultats.

Après avoir mené des études animales et des études cliniques nous constatons qu'il est également nécessaire de travailler sur modèle cellulaire pour résoudre certaines questions, notamment celles qui concernent les mécanismes de la toxicité des matériaux étudiés. C'est pourquoi nous sommes actuellement entrain de développer un modèle de culture primaire à partir de cellules issues de tissu testiculaire humain. Ce tissu est obtenu à l'occasion des biopsies réalisées dans le cadre de l'assistance médicale à la reproduction. Sa congélation et sa mise en culture nous permettrait de

disposer d'un modèle cellulaire innovant et particulièrement intéressant pour nos travaux, ce d'autant plus que les premiers tests de survie cellulaire donnent des résultats très encourageants.

Toujours dans l'optique de disposer de modèles cellulaires adaptés, nous souhaitons organiser un partenariat avec une équipe lyonnaise ayant développé un modèle de barrière hémato-testiculaire *in vitro*<sup>173-175</sup>. En effet, nous avons vu que les connaissances étaient particulièrement lacunaires sur les interactions possibles entre les nanoparticules et la barrière hémato-testiculaire ainsi que sur leur capacité à la franchir. L'utilisation d'un tel modèle nous permettrait de répondre à ces questions de façon plus convaincante que ce qui a été fait jusqu'à maintenant.

Enfin, dans l'objectif de poursuivre nos travaux étudiant la toxicité de l'aluminium sur la fonction de reproduction masculine, nous souhaiterions intégrer un projet européen visant à évaluer l'impact sur la santé humaine de l'exposition alimentaire à l'aluminium, qui rappelons-le est la plus importante en dehors des expositions professionnelles. Dans le cadre de ce projet, notre premier objectif sera de développer un questionnaire adapté à la mesure de cette exposition, en partenariat avec une équipe autrichienne travaillant sur le sujet. Nous réaliserons ensuite une étude qui évaluera à la fois l'impact de cette exposition alimentaire sur la quantité d'aluminium présente dans le sperme de patients consultants pour une prise en charge en aide médicale à la procréation et l'impact de cette exposition sur le taux de succès des traitements mis en œuvre.



---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. La fertilité masculine diminue-t-elle vraiment ? at <<http://sante.lefigaro.fr/actualite/2012/12/11/19550-fertilite-masculine-diminue-t-elle-vraiment>>
2. Fertilité masculine : les dangers avérés des perturbateurs endocriniens. *Le Monde.fr* at <[http://www.lemonde.fr/planete/article/2012/12/05/fertilite-masculine-les-dangers-averes-des-perturbateurs-endocriniens\\_1800127\\_3244.html](http://www.lemonde.fr/planete/article/2012/12/05/fertilite-masculine-les-dangers-averes-des-perturbateurs-endocriniens_1800127_3244.html)>
3. France - Le spermatozoïde français, une espèce en voie de disparition ? *France 24* at <<http://www.france24.com/fr/20121205-france-etude-qualite-baisse-sperme-spermatozoide-reproduction-procreation-fecondite-fertilite/>>
4. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **305**, 609–613 (1992).
5. Swan, S. H., Elkin, E. P. & Fenster, L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ. Health Perspect.* **105**, 1228–1232 (1997).
6. Facemire, C. F., Gross, T. S. & Guillette, L. J. Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environ. Health Perspect.* **103 Suppl 4**, 79–86 (1995).
7. Guillette, L. J., Pickford, D. B., Crain, D. A., Rooney, A. A. & Percival, H. F. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocrinol.* **101**, 32–42 (1996).
8. Auger, J. Les différentes anomalies de la reproduction masculine sont-elles en augmentation ? Faits et controverses, possibles facteurs en cause: une analyse actualisée des données de la littérature et des registres. *Andrologie* **21**, 7–23 (2011).
9. Adami, H. O. *et al.* Testicular cancer in nine northern European countries. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **59**, 33–38 (1994).
10. Auger, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F. & Jouannet, P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.* **332**, 281–285 (1995).
11. Bujan, L., Mansat, A., Pontonnier, F. & Mieusset, R. Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *BMJ* **312**, 471–472 (1996).
12. Spingart, C. *et al.* Semen variation in a population of fertile donors: evaluation in a French centre over a 34-year period. *Int. J. Androl.* **35**, 467–474 (2012).
13. Auger, J. & Jouannet, P. Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. Fédération Française des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **12**, 740–745 (1997).
14. Bujan, L. & Auger, J. Évolution temporelle et géographique des caractéristiques du sperme en France et dans le monde. Quo vadis ? *Bull. Épidémiologique Hebd.* **7-8-9**, (2012).
15. Jørgensen, N. *et al.* Regional differences in semen quality in Europe. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **16**, 1012–1019 (2001).
16. Ramlau-Hansen, C. H. *et al.* Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **22**, 188–196 (2007).
17. Ramlau-Hansen, C. H. *et al.* Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am. J. Epidemiol.* **165**, 1372–1379 (2007).
18. Jensen, M. S., Mabeck, L. M., Toft, G., Thulstrup, A. M. & Bonde, J. P. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **20**, 2559–2566 (2005).
19. Bonde, J. P. *et al.* Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels. *Occup. Environ. Med.* **59**, 234–242 (2002).
20. Mieusset, R. & Bujan, L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int. J. Androl.* **18**, 169–184 (1995).
21. Whorton, D., Krauss, R. M., Marshall, S. & Milby, T. H. Infertility in male pesticide workers. *Lancet* **2**, 1259–1261 (1977).
22. Whorton, D. & Folliart, D. DBCP: eleven years later. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **2**, 155–161 (1988).
23. Toppari, J. *et al.* Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* **104 Suppl 4**, 741–803 (1996).

24. Colborn, T. & Carroll, L. E. Pesticides, Sexual Development, Reproduction, and Fertility: Current Perspective and Future Direction. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **13**, 1078–1110 (2007).
25. Matthiessen, P. & Johnson, I. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* **146**, 9–18 (2007).
26. Kortenkamp, A. Low dose mixture effects of endocrine disruptors: implications for risk assessment and epidemiology. *Int. J. Androl.* **31**, 233–240 (2008).
27. Slama, R. & Siroux, V. Several time-varying risks factors are needed to influence the population mean of a biological parameter. *Epidemiology* (2012).
28. Netter, F.-H. *Atlas d'anatomie humaine*. (Elsevier Masson, 2009).
29. Kierszenbaum, A. L. *Histology and cell biology*. (Elsevier Health Sciences, 2002).
30. Dadoune, J.-P. *Histologie*. (Flammarion médecine-sciences, 2000).
31. Lucas, B., Fields, C. & Hofmann, M.-C. Signaling pathways in spermatogonial stem cells and their disruption by toxicants. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **87**, 35–42 (2009).
32. COLLECTIF. *PETIT ROBERT LANGUE FSE 2015*. (Le Robert, 2014).
33. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil. Steril.* **99**, 673–677 (2013).
34. Nanomatériaux, nanoparticules. Ce qu'il faut retenir - Risques - INRS. at <<http://www.inrs.fr/risques/nanomateriaux/ce-qu-il-faut-retenir.html>>
35. Potocnik, J. Commission Recommendations of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Official Journal of the European Union* (2011).
36. ISO, I. TS 80004–1: 2010, Nanotechnologies–Vocabulary–Part 1: Core terms. *Int. Organ. Stand. Geneva* (2010).
37. Gaffet, E. Nanomatériaux : Une revue des définitions, des applications et des effets sur la santé. Comment implémenter un développement sûr. *Comptes Rendus - Phys.* **12**, 648–658 (2011).
38. Buzea, C., Pacheco, I. I. & Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, MR17–71 (2007).
39. ANSES. Évaluation des risques liés aux nanomatériaux. Enjeux et mise à jour des connaissances. (2014).
40. Oyewumi, M. O., Kumar, A. & Cui, Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev. Vaccines* **9**, 1095–1107 (2010).
41. L Araujo, M. S. Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and in oil vehicles. *Int. J. Pharm.* **176**, 209–224 (1999).
42. Kim, J. S. *et al.* Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **89**, 338–347 (2006).
43. Kwon, J.-T. *et al.* Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *J. Occup. Health* **50**, 1–6 (2008).
44. De Jong, W. H. *et al.* Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* **29**, 1912–1919 (2008).
45. Kim, Y. S. *et al.* Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **7**, 20 (2010).
46. Park, E.-J. *et al.* Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **30**, 162–168 (2010).
47. Lankveld, D. P. K. *et al.* The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* **31**, 8350–8361 (2010).
48. Bai, Y. *et al.* Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 683–689 (2010).
49. Balasubramanian, S. K. *et al.* Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials* **31**, 2034–2042 (2010).
50. Geraets, L., Oomen, A. G., Schroeter, J. D., Coleman, V. A. & Cassee, F. R. Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: results from a 28-day exposure study. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **127**, 463–473 (2012).

51. Morishita, Y. *et al.* Distribution and histologic effects of intravenously administered amorphous nanosilica particles in the testes of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **420**, 297–301 (2012).
52. van der Zande, M. *et al.* Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* **6**, 7427–7442 (2012).
53. Lee, J. H. *et al.* Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 36 (2013).
54. Gao, G. *et al.* Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *J. Hazard. Mater.* **258-259**, 133–143 (2013).
55. Lee, Y. *et al.* Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology* **7**, 1120–1130 (2013).
56. Wang, C., Shang, C. & Westerhoff, P. Quantification of fullerene aggregate nC60 in wastewater by high-performance liquid chromatography with UV-vis spectroscopic and mass spectrometric detection. *Chemosphere* **80**, 334–339 (2010).
57. Wang, Z. *et al.* Reproductive toxicity in adult male rats following intra-articular injection of cobalt-chromium nanoparticles. *J. Orthop. Sci. Off. J. Jpn. Orthop. Assoc.* **18**, 1020–1026 (2013).
58. Zhao, H., Gu, W., Ye, L. & Yang, H. Biodistribution of PAMAM dendrimer conjugated magnetic nanoparticles in mice. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **25**, 769–776 (2014).
59. Garcia, T. X., Costa, G. M. J., França, L. R. & Hofmann, M.-C. Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **45**, 59–70 (2014).
60. Meena, R., Kajal, K. & R, P. Cytotoxic and genotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles in testicular cells of male wistar rat. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **175**, 825–840 (2015).
61. Choi, J. *et al.* Toxicity of zinc oxide nanoparticles in rats treated by two different routes: single intravenous injection and single oral administration. *J. Toxicol. Environ. Health A* **78**, 226–243 (2015).
62. Liu, J., Wang, Z., Liu, F. D., Kane, A. B. & Hurt, R. H. Chemical Transformations of Nanosilver in Biological Environments. *ACS Nano* **6**, 9887–9899 (2012).
63. Meena, R., Kajal, K. & R, P. Cytotoxic and genotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles in testicular cells of male wistar rat. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **175**, 825–840 (2015).
64. Zhao, X. *et al.* Mechanisms of nanosized titanium dioxide-induced testicular oxidative stress and apoptosis in male mice. *Part. Fibre Toxicol.* **11**, 47 (2014).
65. Ema, M., Kobayashi, N., Naya, M., Hanai, S. & Nakanishi, J. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **30**, 343–352 (2010).
66. McAuliffe, M. E. & Perry, M. J. Are nanoparticles potential male reproductive toxicants? A literature review. *Nanotoxicology* **1**, 204–210 (2007).
67. Taylor, U., Barchanski, A., Kues, W., Barcikowski, S. & Rath, D. Impact of metal nanoparticles on germ cell viability and functionality. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* **47 Suppl 4**, 359–368 (2012).
68. Taylor, U. *et al.* Toxicity of gold nanoparticles on somatic and reproductive cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **733**, 125–133 (2012).
69. Poma, A., Colafarina, S., Fontecchio, G. & Chichiricò, G. Transgenerational effects of NMs. *Adv. Exp. Med. Biol.* **811**, 235–254 (2014).
70. Lan, Z. & Yang, W.-X. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *Nanomed.* **7**, 579–596 (2012).
71. Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J. J. & Hofmann, M.-C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **88**, 412–419 (2005).
72. Braydich-Stolle, L. K. *et al.* Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **116**, 577–589 (2010).
73. Komatsu, T. *et al.* The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **22**, 1825–1831 (2008).

74. Asare, N. *et al.* Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* **291**, 65–72 (2012).
75. Wiwanitkit, V., Sereemasapun, A. & Rojanathanes, R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertil. Steril.* **91**, e7–8 (2009).
76. Barkhordari, A. *et al.* Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. *Iran. J. Reprod. Med.* **11**, 767–771 (2013).
77. Moretti, E. *et al.* In vitro effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa. *Andrologia* **45**, 392–396 (2013).
78. Chernousova, S. & Epple, M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **52**, 1636–1653 (2013).
79. Ben-David Makhiluf, S., Qasem, R., Rubinstein, S., Gedanken, A. & Breitbart, H. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **22**, 9480–9482 (2006).
80. Taylor, U. *et al.* Gold nanoparticles interfere with sperm functionality by membrane adsorption without penetration. *Nanotoxicology* **8 Suppl 1**, 118–127 (2014).
81. Yoshida, S. *et al.* Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *Int. J. Androl.* **32**, 337–342 (2009).
82. Li, C. *et al.* Effects of in utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular function in immature male rats. *Toxicol. Lett.* **185**, 1–8 (2009).
83. Gromadzka-Ostrowska, J. *et al.* Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol. Lett.* **214**, 251–258 (2012).
84. Sung, J. H. *et al.* Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **108**, 452–461 (2009).
85. Kyjovska, Z. O. *et al.* Daily sperm production: application in studies of prenatal exposure to nanoparticles in mice. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **36**, 88–97 (2013).
86. Xu, Y. *et al.* Exposure to silica nanoparticles causes reversible damage of the spermatogenic process in mice. *PloS One* **9**, e101572 (2014).
87. Jia, F., Sun, Z., Yan, X., Zhou, B. & Wang, J. Effect of pubertal nano-TiO<sub>2</sub> exposure on testosterone synthesis and spermatogenesis in mice. *Arch. Toxicol.* **88**, 781–788 (2014).
88. Tassinari, R. *et al.* Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology* **8**, 654–662 (2014).
89. Chen, J. *et al.* Sex differences in the toxicity of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in mice. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 2409–2419 (2013).
90. Miresmaeili, S. M. *et al.* Evaluating the role of silver nanoparticles on acrosomal reaction and spermatogenic cells in rat. *Iran. J. Reprod. Med.* **11**, 423–430 (2013).
91. Hassankhani, R. *et al.* In vivo toxicity of orally administrated silicon dioxide nanoparticles in healthy adult mice. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**, 1127–1132 (2015).
92. Li, C. *et al.* Effect of nanoparticle-rich diesel exhaust on testosterone biosynthesis in adult male mice. *Inhal. Toxicol.* **24**, 599–608 (2012).
93. Yamagishi, N. *et al.* Effect of nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular and hippocampus steroidogenesis in male rats. *Inhal. Toxicol.* **24**, 459–467 (2012).
94. Li, C. *et al.* Effects of inhaled nanoparticle-rich diesel exhaust on regulation of testicular function in adult male rats. *Inhal. Toxicol.* **21**, 803–811 (2009).
95. Ramdhan, D. H. *et al.* Nanoparticle-rich diesel exhaust may disrupt testosterone biosynthesis and metabolism via growth hormone. *Toxicol. Lett.* **191**, 103–108 (2009).
96. Magdolenova, Z. *et al.* Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* **8**, 233–278 (2014).
97. Kumar, A. & Dhawan, A. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. *Arch. Toxicol.* **87**, 1883–1900 (2013).
98. Yauk, C. *et al.* Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 605–610 (2008).



99. Earnshaw, A. & Greenwood, N. *Chemistry of the Elements*. (Elsevier, 1997).
100. U.S. Geological Survey. Mineral Commodity Summaries. (2011).
101. Grinberg, I. *L'aluminium, un si léger métal*. (Gallimard, 2003).
102. Cullen, J. M. & Allwood, J. M. Mapping the Global Flow of Aluminum: From Liquid Aluminum to End-Use Goods. *Environ. Sci. Technol.* 130311125652007 (2013). doi:10.1021/es304256s
103. Ai-Ashmawy, M. A. M. Prevalence and public health significance of aluminum residues in milk and some dairy products. *J. Food Sci.* **76**, T73–76 (2011).
104. Veríssimo, M. I. S. & Gomes, M. T. S. R. Aluminium migration into beverages: are dented cans safe? *Sci. Total Environ.* **405**, 385–388 (2008).
105. Seruga, M., Grgić, J. & Mandić, M. Aluminium content of soft drinks from aluminium cans. *Z. Für Lebensm.-Unters. -Forsch.* **198**, 313–316 (1994).
106. Gramiccioni, L., Ingrao, G., Milana, M. R., Santaroni, P. & Tomassi, G. Aluminium levels in Italian diets and in selected foods from aluminium utensils. *Food Addit. Contam.* **13**, 767–774 (1996).
107. AFSSAPS. Évaluation du risque lié à l'utilisation de l'aluminium dans les produits cosmétiques. (2011).
108. Gourier-Fréry, C. *et al.* Aluminium. Quels risques pour la santé ? *Inst. Veille Sanit.* (2000).
109. Pineau, A. *et al.* In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz™ diffusion cell. *J. Inorg. Biochem.* **110**, 21–26 (2012).
110. May, J. C., Progar, J. J. & Chin, R. The aluminum content of biological products containing aluminum adjuvants: determination by atomic absorption spectrometry. *J. Biol. Stand.* **12**, 175–183 (1984).
111. Exley, C. Aluminium adjuvants and adverse events in sub-cutaneous allergy immunotherapy. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **10**, 4 (2014).
112. Klein, G. L., Alfrey, A. C., Shike, M. & Sherrard, D. J. Parenteral drug products containing aluminum as an ingredient or a contaminant: response to FDA notice of intent. ASCN/ASPEN Working Group on Standards for Aluminum Content of Parenteral Nutrition Solutions. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 399–402 (1991).
113. CFR - Code of Federal Regulations Title 21. at <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=201.323>>
114. Poole, R. L., Hintz, S. R., Mackenzie, N. I. & Kerner, J. A., Jr. Aluminum exposure from pediatric parenteral nutrition: meeting the new FDA regulation. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **32**, 242–246 (2008).
115. Exley, C. Human exposure to aluminium. *Environ. Sci. Process. Impacts* **15**, 1807 (2013).
116. Exley, C., Begum, A., Woolley, M. P. & Bloor, R. N. Aluminum in tobacco and cannabis and smoking-related disease. *Am. J. Med.* **119**, 276.e9–11 (2006).
117. Alfrey, A. C. *et al.* Syndrome of dyspraxia and multifocal seizures associated with chronic hemodialysis. *Trans. - Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **18**, 257–261, 266–267 (1972).
118. Alfrey, A. C., LeGendre, G. R. & Kaehny, W. D. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.* **294**, 184–188 (1976).
119. Sprague, S. M., Corwin, H. L., Wilson, R. S., Mayor, G. H. & Tanner, C. M. Encephalopathy in chronic renal failure responsive to deferoxamine therapy. Another manifestation of aluminum neurotoxicity. *Arch. Intern. Med.* **146**, 2063–2064 (1986).
120. Bishop, N. J., Morley, R., Day, J. P. & Lucas, A. Aluminum neurotoxicity in preterm infants receiving intravenous-feeding solutions. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1557–1561 (1997).
121. Bolla, K. I. *et al.* Neurocognitive effects of aluminum. *Arch. Neurol.* **49**, 1021–1026 (1992).
122. Hosovski, E., Mastelica, Z., Sunderić, D. & Radulović, D. Mental abilities of workers exposed to aluminium. *Med. Lav.* **81**, 119–123 (1990).
123. Gherardi, R. K., Eidi, H., Crépeaux, G., Authier, F. J. & Cadusseau, J. Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines. *Front. Neurol.* **6**, 4 (2015).
124. Authier, F.-J. & Gherardi, R. K. [Macrophage mediated myofasciitis: current state of knowledge]. *Rev. Neurol. (Paris)* **163**, 985–993 (2007).



125. Klein, G. L. *et al.* Aluminum as a factor in the bone disease of long-term parenteral nutrition. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **95**, 155–164 (1982).
126. Klein, G. L. *et al.* Aluminum loading during total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **35**, 1425–1429 (1982).
127. Ott, S. M. *et al.* Aluminum is associated with low bone formation in patients receiving chronic parenteral nutrition. *Ann. Intern. Med.* **98**, 910–914 (1983).
128. Hackenberg, U. Chronic ingestion by rats of standard diet treated with aluminum phosphide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **23**, 147–158 (1972).
129. Oneda, S. *et al.* Chronic toxicity and tumorigenicity study of aluminum potassium sulfate in B6C3F1 mice. *Vivo Athens Greece* **8**, 271–278 (1994).
130. Schroeder, H. A. & Mitchener, M. Life-term studies in rats: effects of aluminum, barium, beryllium, and tungsten. *J. Nutr.* **105**, 421–427 (1975).
131. Namer, M., Luporsi, E., Gligorov, J., Lokiec, F. & Spielmann, M. [The use of deodorants/antiperspirants does not constitute a risk factor for breast cancer]. *Bull. Cancer (Paris)* **95**, 871–880 (2008).
132. Antiperspirants/Deodorants and Breast Cancer. *National Cancer Institute* at <<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/AP-Deo>>
133. Mirick, D. K., Davis, S. & Thomas, D. B. Antiperspirant use and the risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1578–1580 (2002).
134. Kamboj, V. P. & Kar, A. B. Antitesticular effect of metallic and rare earth salts. *J. Reprod. Fertil.* **7**, 21–28 (1964).
135. Abdel-Moneim, A. M. Effects of taurine against histomorphological and ultrastructural changes in the testes of mice exposed to aluminium chloride. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **64**, 405–414 (2013).
136. Kutlubay, R. *et al.* Vitamin E protection from testicular damage caused by intraperitoneal aluminium. *Int. J. Toxicol.* **26**, 297–306 (2007).
137. Yousef, M. I., El-Morsy, A. M. A. & Hassan, M. S. Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* **215**, 97–107 (2005).
138. Yousef, M. I., Kamel, K. I., El-Guendi, M. I. & El-Demerdash, F. M. An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants. *Toxicology* **239**, 213–223 (2007).
139. Yousef, M. I. & Salama, A. F. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **47**, 1168–1175 (2009).
140. Guo, C.-H., Huang, C.-J., Chiou, Y.-L. & Hsu, G.-S. W. Alteration of trace element distribution and testis ACE activity in mice with high peritoneal aluminum. *Biol. Trace Elem. Res.* **86**, 145–157 (2002).
141. Krasovskii, G. N., Vasukovich, L. Y. & Chariev, O. G. Experimental study of biological effects of leads and aluminum following oral administration. *Environ. Health Perspect.* **30**, 47–51 (1979).
142. Chaitanya, T. V. B., Mallipeddi, K., Bondili, J. S. & Nayak, P. Effect of aluminum exposure on superoxide and peroxide handling capacities by liver, kidney, testis and temporal cortex in rat. *Indian J. Biochem. Biophys.* **49**, 395–398 (2012).
143. Guo, C.-H., Huang, C.-J., Chen, S.-T. & Wang Hsu, G.-S. Serum and testicular testosterone and nitric oxide products in aluminum-treated mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **10**, 53–60 (2001).
144. Sun, H. *et al.* Effects of aluminum exposure on serum sex hormones and androgen receptor expression in male rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **144**, 1050–1058 (2011).
145. Guo, C.-H., Lu, Y.-F. & Hsu, G.-S. W. The influence of aluminum exposure on male reproduction and offspring in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **20**, 135–141 (2005).
146. Katz, A. C., Frank, D. W., Sauerhoff, M. W., Zwicker, G. M. & Freudenthal, R. I. A 6-month dietary toxicity study of acidic sodium aluminium phosphate in beagle dogs. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **22**, 7–9 (1984).

147. Llobet, J. M., Colomina, M. T., Sirvent, J. J., Domingo, J. L. & Corbella, J. Reproductive toxicology of aluminum in male mice. *Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* **25**, 45–51 (1995).
148. Sharma, S. *et al.* Synthesis and characterisation of some new aluminium derivatives of Schiff bases containing N, O and S donor atoms and the anti fertility activity of the derivative Al[SC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N:C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>]<sub>3</sub>. *Bioinorg. Chem. Appl.* 215–225 (2003). doi:10.1155/S1565363303000177
149. Hirata-Koizumi, M. *et al.* Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of aluminium ammonium sulfate in a two-generation study in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **49**, 1948–1959 (2011).
150. Zhu, Y. Z. *et al.* Effects of sub-chronic aluminum chloride on spermatogenesis and testicular enzymatic activity in male rats. *Life Sci.* **102**, 36–40 (2014).
151. Hovatta, O. *et al.* Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **13**, 115–119 (1998).
152. Dawson, E. B., Ritter, S., Harris, W. A., Evans, D. R. & Powell, L. C. Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels. *Biol. Trace Elem. Res.* **64**, 215–219 (1998).
153. Elhajji, A. Spectrométrie d'absorption atomique.
154. Ecole des Mines de Saint-Etienne. Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation : spectrométrie d'absorption atomique.
155. Paucot, H. & Potin-Gautier, M. ICP-MS : couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie de masse. *Tech. Ing.* **P2720**, (2010).
156. Mermet, J.-M., Trassy, C. & Robin, J. Excitation spectrographique. *Tech. Ing.* **P2719**, (1988).
157. Pecora, R. *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy.* (Springer, 1985).
158. Paqueton, H. & Ruste, J. Microscopie électronique à balayage - Principe et équipement. *Tech. Ing.* **P865**, (2006).
159. Microscopie électronique en transmission. *Wikipédia* (2015). at <[https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Microscopie\\_%C3%A9lectronique\\_en\\_transmission&oldid=116823346](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Microscopie_%C3%A9lectronique_en_transmission&oldid=116823346)>
160. Kammer, F. von der *et al.* Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): General considerations and conceptual case studies. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 32–49 (2012).
161. Elsaesser, A. *et al.* Quantification of nanoparticle uptake by cells using microscopical and analytical techniques. *Nanomed.* **5**, 1447–1457 (2010).
162. Fraikin, J.-L., Teesalu, T., McKenney, C. M., Ruoslahti, E. & Cleland, A. N. A high-throughput label-free nanoparticle analyser. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 308–313 (2011).
163. Peek, L. J., Middaugh, C. R. & Berkland, C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 915–928 (2008).
164. Gregory, A. E., Titball, R. & Williamson, D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 13 (2013).
165. OECD. Safety of manufactured nanomaterials. List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials: Revision. *ENV/JM/MONO* **46**, (2010).
166. Malvern. *Zetasizer nano series, user manual.* (Malvern Instruments Ltd., 2009).
167. Valkonen, S. & Aitio, A. Analysis of aluminium in serum and urine for the biomonitoring of occupational exposure. *Sci. Total Environ.* **199**, 103–110 (1997).
168. Zhao, X. *et al.* Retraction Note: Mechanisms of nanosized titanium dioxide-induced testicular oxidative stress and apoptosis in male mice. *Part. Fibre Toxicol.* **12**, 23 (2015).
169. Klein, J.-P. *et al.* Testicular biodistribution of 450 nm fluorescent latex particles after intramuscular injection in mice. *Biomed. Microdevices* **15**, 427–436 (2013).
170. O'Shaughnessy, P. T. Occupational health risk to nanoparticulate exposure. *Environ. Sci. Process. Impacts* **15**, 49–62 (2013).

171. Meesters, J. A. J., Veltman, K., Hendriks, A. J. & van de Meent, D. Environmental exposure assessment of engineered nanoparticles: why REACH needs adjustment. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **9**, e15–26 (2013).
172. Bencsik, A. [Is the brain protected from the impact of nanomaterial exposure?]. *Biol. Aujourd'hui* **208**, 159–165 (2014).
173. Ali, S. *et al.* Exposure to low-dose bisphenol A impairs meiosis in the rat seminiferous tubule culture model: a physiotoxicogenomic approach. *PLoS One* **9**, e106245 (2014).
174. Geoffroy-Siraudin, C. *et al.* Validation of a rat seminiferous tubule culture model as a suitable system for studying toxicant impact on meiosis effect of hexavalent chromium. *Toxicol. Sci.* **116**, 286–296 (2010).
175. Perrard, M.-H. *et al.* [European regulation REACH and the assessment of testicular toxicity]. *Médecine Sci. MS* **26**, 305–310 (2010).

## RESUME

Depuis quelques décennies une diminution de la qualité du sperme a été constatée dans la majorité des pays occidentaux. Si les raisons de cette diminution sont encore incomplètement comprises, des facteurs environnementaux pourraient y contribuer grandement. Parmi eux, l'exposition à certains matériaux, comme les nanomatériaux et l'aluminium, a grandement augmenté durant cette même période. Notre objectif a donc été d'évaluer l'impact de ces expositions sur la fonction de reproduction masculine. Pour ce faire, nous avons réalisé deux études de la biodistribution testiculaire des particules après injection par voie intramusculaire sur un modèle de souris, une étude clinique visant à évaluer la charge du plasma sérial en nanoparticules et à la corréler avec le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat et une étude clinique visant à évaluer l'impact de la charge spermatique en aluminium sur les paramètres spermatiques. Les résultats de ces travaux couplés à l'analyse de la littérature nous rassurent sur la reprotoxicité masculine des nanoparticules mais montrent l'existence d'un impact potentiellement négatif de l'aluminium. Dans les deux cas, de nouvelles études devront poursuivre l'exploration de ces questions.

**Mots clés :** Nanomatériaux, nanoparticules, aluminium, fertilité masculine, testicules, paramètres spermatiques, biodistribution.

## ABSTRACT

In recent decades a decrease in sperm quality was observed in most Western countries. While the reasons for this decline are not yet fully understood, environmental factors could greatly contribute. Among them, exposure to materials such as nanomaterials and aluminium, has greatly increased during this period. Therefore, our goal was to assess these exposures impact on male reproductive function. To do so, we conducted two studies to determine testis biodistribution of particles after intramuscular injection in a mouse model. We also conducted two clinical studies, first one to assess the burden of nanoparticles in seminal plasma and to correlate it with sperm count and the second one to evaluate the impact of the aluminum load in semen on sperm parameters. The results of these works and the analysis of literature reassure us about male reproductive toxicity of nanoparticles but revealed a potentially negative impact of aluminum. In both cases, new studies will be needed to further explore these issues.

**Keywords:** Nanostructures, nanoparticles, aluminium, male fertility, testis, semen analysis, tissue distribution.