
Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement

Saisine n°2008/005

**RAPPORT
d'expertise collective**

Comité d'Experts Spécialisés « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements »

Groupe de Travail « Nanomatériaux - exposition du consommateur et de l'environnement »

Mars 2010

Mots clés

Nanomatériau, évaluation du risque, exposition, produit fini, consommateur, population générale, environnement

Présentation des intervenants

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Fabrice Nesslany – Chef adjoint du service de toxicologie génétique de l'Institut Pasteur de Lille – Toxicologue.

Membres

Mme Magali BOIZE – Pharmacien évaluateur des risques sanitaires – Électricité de France (EDF) – Evaluation et prévention des risques.

M. Jean-Yves BOTTERO – Directeur du Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement (Cerege) – Ecotoxicologie.

M. Dany CHEVALIER – Docteur en pharmacie - Maître de conférences – Toxicologue.

M. Eric GAFFET – Directeur de recherche au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) – *Nanomaterials Research Group* / UMR 5060 – Nanomatériaux.

M. Olivier LE BIHAN – Ingénieur études et recherche à l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (Ineris) – Métrologie/analyse de cycle de vie.

Mme Catherine MOUNEYRAC – Directrice de l'institut de biologie et d'écologie appliquée à l'université catholique de l'ouest (UCO) – Ecotoxicologie.

M. Michael RIEDIKER – Chef de groupe de recherche à l'institut de santé au travail (IST), Lausanne, Suisse – Évaluation des risques.

M. François TARDIF – Chef de Laboratoire au commissariat à l'énergie atomique (CEA) – Sécurité au travail et nanomatériaux.

RAPPORTEURS

Pour la première partie du traitement de la saisine :

M. Emmanuel FLAHAUT – Chargé de recherche au Centre National de la Recherche Scientifique CNRS – Nanomatériaux.

M. Eric GAFFET – Directeur de recherche au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) – *Nanomaterials Research Group* / UMR 5060 – Nanomatériaux.

M. François TARDIF – Chef de laboratoire au Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) – Sécurité au travail et nanomatériaux.

M. Olivier LE BIHAN – Ingénieur études et recherche à l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (Ineris) – Hygiène industrielle et nanomatériaux.

Experts rapporteurs¹ auprès du groupe de travail :

M. Mostafa OULDELHKIM – Chef de projet à l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) – Toxicologue.

¹ L'Afsaps, à travers deux de ses experts a participé à l'audition d'un industriel et a apporté quelques contributions ponctuelles au rapport.

Mme Cécile VERDIER – Evalueur toxicologue à l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps).

ADOPTION DU RAPPORT PAR LE COMITE D'EXPERTS SPECIALISES

Ce rapport a été soumis pour commentaires au CES :

- Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements

Président

M. Jean-François DORÉ – Directeur de Recherche Émérite à l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (Inserm) - Champs électromagnétiques non ionisants – Ultra-violets.

Membres

Fabienne ANFOSSO-LÉDÉE – Ingénieur de recherche au Laboratoire Central des Ponts et Chaussées (LCPC) – Bruit.

Michel BÉRENGIER – Adjoint au Chef de la division Entretien, Sécurité et Acoustique des Routes au Laboratoire Central des Ponts et Chaussées (LCPC) – Bruit.

Jean-Pierre CÉSARINI – Retraité (Directeur du laboratoire de recherche sur les tumeurs de la peau humaine, fondation A. de Rothschild et Inserm) – Ultra-violets.

Jean-Claude COHEN – Coordinateur en biométéorologie à Météo France – Météorologie et santé.

Daniel COURANT – Chercheur, chef de projet au Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) – Rayonnements non ionisants (lasers, ultra-violets).

Frédéric COUTURIER – Responsable du département "Études" à l'Agence Nationale des Fréquences (ANFR) – Rayonnements non ionisants.

Jean-Claude DEBOUZY – Directeur du département « effets biologiques des rayonnements-biophysique » de l'institut de recherches biomédicales du service de santé des armées (IRBA-CRSSA) – Champs électromagnétiques non ionisants.

Aïcha EL KHATIB – Chargée de mission à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris - Hôpital Avicenne – Exposition et pathologies professionnelles.

Emmanuel FLAHAUT – Chargé de recherche au Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) – Nanomatériaux.

Eric GAFFET – Directeur de recherche *Nanomaterials research Group* au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) – Nanomatériaux.

Martine HOURS – Chargée de recherche à l'Institut National de Recherche sur les Transports et leur Sécurité (Inrets) – Rayonnements non ionisants.

Agnès JOB – Chercheur au Centre de Recherche du Service de Santé des Armées (CRSSA) – Bruit.

Antoine LABEYRIE – Professeur au Collège de France – Environnement et santé.

Jacques LAMBERT – Directeur de recherche à l'Institut National de Recherche sur les Transports et leur Sécurité (Inrets) – Bruit.

Dominique LAURIER – Adjoint au chef de laboratoire d'épidémiologie à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) – Epidémiologie.

Olivier LE BIHAN – Ingénieur études et recherche à l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (Ineris) – Hygiène industrielle et nanomatériaux.

Philippe LEPOUTRE – Responsable du pôle technique auprès de l’Autorité de Contrôle des Nuisances Sonores Aéroportuaires (Acnusa) – Bruit.

Didier MARCHAL – Directeur Hygiène Sécurité Environnement (HSE) Europe de la division *Automotive Experience* de Johnson Controls Inc. – Santé au travail.

Annie MOCH – Professeur à l’Université Paris X Nanterre – Bruit.

Philippe PIRARD – Médecin épidémiologiste au Département Santé Environnement à l’Institut national de Veille Sanitaire (IVS) – Epidémiologie.

Serge PLANTON – Ingénieur en chef à Météo France – Météorologie et santé.

Michel RUMEAU – Ingénieur en chef de la section acoustique, adjoint au chef de département de mesures physiques au Laboratoire Central de la Préfecture de Police (LCP) – Bruit.

René DE SÈZE – Directeur de recherche à l’Institut National de l’Environnement Industriel et des Risques (Ineris) – Rayonnements non ionisants.

François TARDIF – Chef de laboratoire au Commissariat à l’Energie Atomique (CEA) – Sécurité au travail et nanomatériaux.

Michel VALLET – Retraité (Directeur de Recherche à l’Institut National de Recherche sur les Transports et leur Sécurité (Inrets) – Bruit

Paolo VECCHIA – Directeur de recherche à l’*Istituto Superiore di Sanità* (ISS, Rome, Italie) – Rayonnements non ionisants.

Les travaux du groupe de travail ont été adoptés par le CES « agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » le : 23 novembre 2009.

PARTICIPATION AFSSET

Coordination scientifique

Mlle Aurélie NIAUDET – Chargée de projets scientifiques - Unité sources et procédés – Afsset

M. Anthony CADENE – Chargé de projets scientifiques - Unité agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements – Afsset

M. Olivier MERCKEL – Chef de l’unité « agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » – Afsset

Contribution scientifique

M. Guillaume BOURDEL – Chef de projets scientifiques dans l’unité agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements – Afsset

Mlle Nathalie THIERIET - Chef de projets scientifiques dans l’unité agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements – Afsset

Secrétariat administratif

Mme Sophia SADDOKI – Afsset

AUDITION DE PERSONNALITES EXTERIEURES

Des représentants de producteurs du secteur de la protection solaire et du secteur des silices alimentaires ont été auditionnés par le groupe de travail.

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
EXPERTISE COLLECTIVE :	9
SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS.....	9
Abréviations	16
Définitions	17
Liste des tableaux.....	18
Liste des figures.....	19
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	20
1.1 Contexte.....	20
1.2 Objet.....	21
1.3 Modalités de traitement de la saisine.....	21
1.3.1 Déroulement de la saisine.....	21
1.3.2 Critères de qualité en expertise.....	22
2 Nanomatériaux et biens de consommation : état du marché	23
2.1 Définition du marché du consommateur	23
2.2 Nanomatériaux dans les biens de consommation.....	34
2.2.1 Propriétés des nanomatériaux	34
2.2.2 Exemples d'utilisations dans les produits de consommation	35
3 Nanomatériaux et cycle de vie	36
3.1 Principes et définitions classiques	36
3.2 Cycle de vie des produits contenant des nanomatériaux : illustration et discussion .	38
3.2.1 Historique du produit :	38
3.2.2 Etude de cas : vieillissement accéléré d'un produit fini	39
3.2.3 Etude de cas : état de l'art concernant le nano-argent.....	40
3.2.4 Discussion	41
3.3 Définition du champ d'analyse pour l'étude.....	41
4 Recensement et sélection des produits	42
4.1 Méthodologie de recensement	42
4.1.1 Informations recherchées.....	42

4.1.2 Sources consultées	43
4.1.3 Principales difficultés rencontrées pour le recensement des produits finis contenant des nanomatériaux manufacturés :	44
4.1.4 Résultat du recensement	44
4.2 Sélection des produits.....	46
4.3 Résultat du choix des produits.....	48
5 Méthodologie d'évaluation des risques.....	50
5.1 Discussion pour la construction d'une échelle de cotation du risque	53
5.2 Méthode employée pour l'évaluation qualitative des risques	56
5.2.1 Méthode d'élaboration des scénarios d'exposition.....	56
5.2.2 Méthode d'identification des dangers et évaluation des risques	57
5.2.3 Méthode d'évaluation des risques :	57
6 Evaluation des risques pour les produits sélectionnés.....	58
6.1 Introduction	58
6.2 Effets biologiques potentiels des nanoparticules	58
6.2.1 Toxicologie	58
6.2.2 Écotoxicologie	62
6.3 Textile et argent.....	63
6.3.1 Evaluation de l'exposition.....	64
6.3.1.1 Caractérisation du produit sélectionné	64
6.3.1.2 Définition du scénario d'exposition pour l'homme	66
6.3.1.3 Définition du scénario de dispersion environnementale	67
6.3.2 Evaluation du danger	69
6.3.2.1 Danger pour l'homme	69
6.3.2.2 Danger pour l'environnement	72
6.3.3 Evaluation du risque	77
6.3.3.1 Discussion des résultats	77
6.3.3.2 Discussion et identification des incertitudes	77
6.3.3.3 Conclusion	78
6.4 Ciments et dioxyde de titane	78
6.4.1 Evaluation de l'exposition.....	80
6.4.1.1 Définition de scénarios d'exposition pour l'homme.....	81
6.4.1.2 Définition du scénario de dispersion environnementale	83
6.4.2 Evaluation du danger	84
6.4.2.1 Danger pour l'homme	84
6.4.2.2 Danger pour l'environnement	93
6.4.3 Evaluation du risque	95
6.4.3.1 Discussion des résultats	95
6.4.3.2 Discussion et identification des incertitudes	95
6.4.3.3 Conclusion	96
6.5 Crème solaire et dioxyde de titane.....	96
6.5.1 Evaluation de l'exposition.....	96
6.5.1.1 Caractéristiques du produit solaire étudié	97
6.5.1.2 Définition du scénario d'exposition pour l'homme	98
6.5.1.3 Définition du scénario de dispersion environnementale	99
6.5.2 Evaluation du danger	100
6.5.2.1 Danger pour l'homme	100
6.5.2.2 Danger pour l'environnement	106

6.5.3	Évaluation du risque	107
6.5.3.1	Discussion des résultats	107
6.5.3.2	Discussion et identification des incertitudes	107
6.5.3.3	Conclusion	108
6.6	Produit alimentaire et silice	108
6.6.1	Evaluation de l'exposition	109
6.6.1.1	Caractérisation du produit sélectionné :	110
6.6.1.2	Définition du scénario d'exposition pour l'homme :	110
6.6.1.3	Définition du scénario de dispersion environnementale :	111
6.6.2	Évaluation du danger	112
6.6.2.1	Danger pour l'homme	113
6.6.2.2	Danger pour l'environnement	115
6.6.3	Évaluation du risque	117
6.6.3.1	Discussion des résultats	117
6.6.3.2	Discussion et identification des incertitudes	118
6.6.3.3	Conclusion	119
6.7	Discussion et conclusion sur les cas étudiés.....	119
7	Recommandations du groupe de travail	121
8	Bibliographie	124
ANNEXES	136	
Annexe 1 : Lettre de saisine	137	
Annexe 2 : Document support aux auditions	142	
Annexe 3 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine	147	
Annexe 4 : Revue bibliographique de la toxicologie de l'argent nanoparticulaire.....	163	
Annexe 5 : Revue bibliographique de la toxicologie des silices amorphes nanostructurées.....	186	
Annexe 6 : Tableau de synthèse (écotoxicologie)	200	
Annexe 7 : Liste des critères OCDE pour les essais de nanomatériaux	206	

EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et dans l'environnement Saisine Afsset n° « 2008/005 »

Ce document synthétise les travaux du groupe de travail et présente les éventuels compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

L'Afsset a été saisie le 05 juin 2008 par la Direction générale de la santé, la Direction générale de la prévention des risques et la Direction générale du travail pour élaborer et étudier des scénarios d'exposition de la population générale à quelques nanomatériaux manufacturés contenus dans un échantillon de produits mis sur le marché, en prenant en compte les différentes voies d'exposition, afin d'évaluer les risques potentiels pour la population générale. Il était demandé à l'Afsset de s'intéresser aux produits et à leurs utilisations les plus pertinents, afin d'analyser les modalités d'exposition prépondérantes de la population générale.

Contexte scientifique

Les nanomatériaux sont constitués de structures élémentaires dont au moins une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nanomètres. Cette caractéristique dimensionnelle confère à ces matériaux des propriétés ou des comportements particuliers. En raison des nombreuses applications innovantes que laissent entrevoir ces propriétés physiques, chimiques ou biologiques, les nanomatériaux représentent un domaine de la recherche scientifique et technique en pleine expansion.

Les nanomatériaux ne sont plus seulement confinés dans les laboratoires de recherche, mais sont désormais intégrés dans de nombreux procédés industriels et participent à la composition d'une grande variété de produits ou systèmes utilisés dans la vie courante (crèmes solaires, textiles, aliments, domaine des transports, *etc.*). Ces nanomatériaux sont présents dans des secteurs aussi variés que le bâtiment, l'automobile, l'emballage, la chimie, l'environnement, l'énergie ou la santé.

Ces nanomatériaux sont dits manufacturés, car ils sont fabriqués intentionnellement. Ils doivent être distingués de l'ensemble des particules également de tailles inférieures à 100 nm présentes dans le milieu ambiant naturel ou issues involontairement de divers processus industriels ou domestiques non destinés à la fabrication ou à l'utilisation de nanomatériaux (appelées particules ultrafines).

Cet essor rapide entraîne une augmentation de l'exposition de la population aux nanomatériaux manufacturés, concernant en premier lieu les employés de l'industrie et des laboratoires ou les populations riveraines des installations industrielles pour lesquels la possibilité de contact chronique avec les nanomatériaux est en effet la plus élevée : les quantités rencontrées sont les plus importantes et leur manipulation est pour certains employés quotidienne. Cet aspect de l'exposition professionnelle a fait l'objet d'un rapport publié par l'AFSSET en 2008.

Comme toute substance chimique, le devenir des nanoparticules dans l'organisme humain et la toxicité potentielle associée vont dépendre notamment de leurs propriétés physico-chimiques (taille, forme, caractère soluble, *etc.*). Les phénomènes d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion semblent être différents par rapport à une entité chimique classique, de par leurs caractéristiques spécifiques. Il est aujourd'hui évident que la prise en compte d'un nombre restreint

de caractéristiques n'est pas suffisante pour interpréter leurs effets potentiels. De façon générale, l'étude de la transposition des connaissances « micro » à l'échelle nano reste à faire.

Aujourd'hui, la large diffusion de ces nanomatériaux à travers une multitude de produits de consommation courante amène à s'interroger sur l'exposition aux nanomatériaux manufacturés des consommateurs et de la population générale.

Organisation de l'expertise

Conformément à la démarche qualité suivie à l'Afsset s'appuyant sur l'utilisation de la norme NF X 50-110 relative à la qualité en expertise, la demande des ministères en charge de la santé, du travail et de l'environnement a été confiée au CES « agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements ». Ce dernier a, dans un premier temps, mandaté des experts rapporteurs pour réaliser les premiers travaux d'expertise concernant le recensement des produits contenant des nanomatériaux manufacturés et le choix des produits à étudier plus précisément.

Dans un second temps, au vu de la complexité et de la sensibilité de la thématique traitée, l'Afsset a décidé, sur proposition du CES « Évaluation des risques liés aux agents physiques, aux nouvelles technologies et aux grands aménagements » en séance du 9 mars 2009, de constituer un groupe de travail formel rattaché à ce CES et composé d'experts sélectionnés suite à un appel à candidature public. La présidence du groupe de travail a été confiée à M. Fabrice Nesslany (toxicologue – Institut Pasteur de Lille).

Le groupe de travail « nanomatériaux et exposition du consommateur » coordonné par l'Afsset a été constitué au printemps 2009, suite à un appel à candidatures public. Ce groupe de travail multidisciplinaire est constitué d'experts dans les domaines de la mesure de l'exposition, de la métrologie, de la toxicologie, de la biologie et de la physique.

Afin d'instruire cette saisine sur les scénarios d'exposition aux nanomatériaux manufacturés, le groupe de travail s'est réuni 8 fois entre avril et novembre 2009. Lors de séances supplémentaires, 3 auditions d'industriels ont également été réalisées.

L'état d'avancement de ces travaux a été présenté régulièrement au CES « agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements », et discuté au cours de ses séances de travail. Le rapport produit par le groupe de travail tient ainsi compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES ayant pris part aux délibérations.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect des règles de compétence, indépendance, transparence, traçabilité des travaux.

Description de la méthode

En l'absence d'outils d'évaluation des risques disponibles adaptés à la question posée, l'Afsset a proposé d'utiliser une approche qualitative simplifiée des risques pour la santé et pour l'environnement. La majeure partie du travail préliminaire du groupe de travail a consisté à recenser des produits finis disponibles sur le marché français et contenant les nanomatériaux manufacturés les plus utilisés. Si le recensement des produits n'est pas exhaustif, l'Afsset s'est en revanche attachée à consulter toutes les sources d'informations disponibles. Le résultat de ce travail d'inventaire a permis de fournir un document de support pour la phase de sélection de quelques produits pour lesquels des scénarios d'exposition de la population générale et de l'environnement ont été développés. Les risques spécifiques de ces produits contenant des nanomatériaux manufacturés ont été ensuite évalués, de manière qualitative.

Les scénarios associés à chacun des produits ont été réalisés principalement à partir des données bibliographiques suivantes, par ordre décroissant d'intérêt :

- des lignes directrices existantes pour le type de produit ;
- des recommandations d'utilisation par le producteur/distributeur pour un usage normal;
- des usages constatés pour le type de produit ;
- des usages constatés pour des produits de types proches ;
- des données de caractérisation fournies par les industriels lors d'auditions.

Lorsqu'aucune donnée n'était disponible, le scénario a été défini à partir d'hypothèses raisonnables conduisant à une maximisation de l'exposition pour un usage normal, un « pire-cas ».

Résultat de l'expertise collective

Les travaux d'expertise, les conclusions et les recommandations du groupe de travail « nanomatériaux et exposition du consommateur » ont été soumis au CES « Evaluation des risques liés aux Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » sous forme d'un rapport et de la présente synthèse d'expertise collective.

Le CES a adopté les travaux d'expertise collective du groupe de travail ainsi que ses conclusions et recommandations lors de sa séance du 23 novembre 2009 et a fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Conclusions et recommandations de l'expertise collective

Conclusions

L'expertise a permis de mettre en évidence des lacunes dans l'identification des produits concernés et dans l'évaluation des risques pour l'Homme et l'environnement.

De grandes difficultés ont été rencontrées pour identifier des produits contenant des nanomatériaux manufacturés. Le manque de traçabilité des nanomatériaux intégrés dans ces produits finis a ainsi été clairement mis en évidence. Alors que les notions de nanoparticule, d'agglomérat et d'agrégat sont définies dans la norme ISO/TS/27687, des industriels considèrent que leurs produits n'entrent pas dans le cadre de cette définition. Ceci peut entraîner l'absence de déclaration et de recherche spécifique.

Par ailleurs, même lorsqu'un produit contenant des nanomatériaux est identifié, l'accès aux données qui le caractérisent est très limité. Il faut signaler que les outils métrologiques et méthodologiques disponibles aujourd'hui ne permettent pas d'obtenir une caractérisation aussi précise que celle qui est exigée pour évaluer les risques associés.

Un produit contenant des nanomatériaux n'en émet pas forcément sous la même forme que le nanomatériau qui a été intégré au départ dans le produit. D'autre part, l'intégration de nanomatériaux au sein d'un produit n'implique pas nécessairement leur émission au cours de la vie du produit.

L'estimation de l'exposition réelle pour le consommateur est réalisée avec le nanomatériau « sortant ». Ainsi, pour réaliser l'évaluation de risque sur le produit fini, les données toxicologiques et écotoxicologiques du nanomatériau « entrant » sont nécessaires, mais les données sur le nanomatériau « sortant » sont également indispensables.

Il a donc été difficile de caractériser le nanomatériau à chaque étape du cycle de vie du produit associé et de réaliser des scénarios d'exposition pertinents et complets.

L'exposition des consommateurs aux nanomatériaux manufacturés, ainsi que la dispersion environnementale consécutive à leur consommation, se révèlent extrêmement complexes à évaluer, aussi bien qualitativement que quantitativement. Entre autres raisons, on peut citer :

- la faible traçabilité des nanomatériaux dans les produits disponibles à la consommation ;
- la grande variété des produits concernés ;
- les scénarios de consommation et d'exposition des consommateurs restent à définir ;
- la difficulté de la mesure de l'émissivité des produits en fonction de leurs diverses utilisations possibles.

A cette complexité pour estimer des niveaux d'exposition aux nanomatériaux manufacturés pour la population générale s'ajoute le manque de connaissances des effets de ces objets sur la santé et sur l'environnement.

Les études toxicologiques et écotoxicologiques pour lesquelles la caractérisation des nanomatériaux est absente ou incomplète sont nombreuses. Cependant, les articles les plus récents tendent à prendre en compte cet aspect de façon plus rigoureuse.

La plupart des études sur la toxicité et l'écotoxicité des nanoparticules a été conduite avec des nanoparticules de synthèse et donc non issues du produit fini.

La majorité des études sur l'écotoxicité des nanoparticules a été conduite à des concentrations si élevées qu'elles ne reflètent pas la réalité de l'exposition environnementale à ces contaminants. Il faut souligner, dans ce domaine, l'hétérogénéité des travaux et des effets observés selon les espèces, la diversité des protocoles utilisés ainsi que celle des nanoparticules et des doses considérées. La caractérisation de l'exposition aux nanoparticules dans le milieu expérimental est, là aussi, indispensable pour l'analyse et l'interprétation des résultats obtenus.

Les avancées scientifiques et technologiques, ainsi que les propriétés biologiques et physico-chimiques dans ce domaine sont largement décrites par des publications scientifiques particulièrement nombreuses. Par exemple, dans certains cas, une action directe et indirecte sur l'ADN a pu être mise en évidence dans des expérimentations *in vitro*. Néanmoins l'extrapolation à l'Homme est incertaine. Beaucoup d'interrogations subsistent autour des risques pour la santé des personnes et de l'environnement.

En effet, le manque de données épidémiologiques, toxicologiques et écotoxicologiques ne permet pas de mener actuellement une évaluation complète des risques potentiels liés aux nanomatériaux manufacturés contenus dans tous les produits de consommation courante.

Les quatre études de produits finis décrites dans le rapport sont fondées sur des données toxicologiques et écotoxicologiques non spécifiques au produit de consommation considéré.

Ces produits ont été sélectionnés sur la base des critères suivants :

- les données relatives au produit fini sont accessibles ;
- il existe une revendication nano formelle ou déduite ;
- le type de produit fini est largement utilisé et connu du public ;
- les produits permettent au groupe de travail de considérer les différentes voies d'exposition (ingestion, inhalation et cutanée, avec seule considération de l'exposition directe et non accidentelle) ;
- les produits considérés sont de matrices différentes (liquide, solide, poudreux) ;
- l'exposition aux nanomatériaux est l'exposition directe.

Les conclusions de l'expertise sont les suivantes :

Pour le produit A (chaussettes antibactériennes) contenant des nanoparticules d'argent :

pour l'Homme (voie d'exposition cutanée) et l'environnement, si le risque lié à l'utilisation de ce produit ne peut pas être estimé, il ne peut cependant pas être exclu.

En raison de l'augmentation attendue du nombre de produits de consommation intégrant des nanoparticules d'argent, de la diversité de l'exposition et du danger avéré chez certaines espèces animales, le risque pour l'environnement, même s'il n'est pas mesurable aujourd'hui, devra faire l'objet d'une attention particulière.

Pour le produit B (ciment) contenant des nanoparticules de dioxyde de titane :

pour l'Homme (voie d'exposition respiratoire) et pour l'environnement, pour les effets et le produit considérés dans les études disponibles, le risque, s'il ne peut pas être évalué, ne peut pas être exclu en particulier chez les personnes souffrant d'une pathologie respiratoire.

Pour le produit C (lait solaire) contenant des nanoparticules de dioxyde de titane :

pour l'Homme (voie d'exposition cutanée), pour les effets et le produit considérés dans les études analysées, étant données les incertitudes sur le potentiel de pénétration cutanée et sur l'activité phototoxique, les risques ne peuvent pas être exclus.

Pour l'environnement, le risque ne peut être estimé, il ne peut donc pas être exclu.

Pour le produit D (ingrédient silice) :

pour l'Homme (voie d'exposition orale) et pour l'environnement, pour le produit et les effets considérés, le risque, s'il ne peut pas être évalué, ne peut pas être exclu.

Ce rapport a démontré la difficulté de réaliser des évaluations des risques en l'absence de données spécifiques aux nanomatériaux contenus dans les produits finis étudiés mais a également démontré la nécessité du caractère pluridisciplinaire de cette évaluation, notamment en l'absence de méthodologies dédiées.

Bien qu'il y ait des indications de l'existence de danger potentiel pour certaines nanoparticules, pour les quatre cas étudiés, le manque de données (métrologiques, toxicologiques, etc.) ne permet pas d'estimer correctement le risque associé. Ce risque ne peut donc pas théoriquement être exclu.

Recommandations

Compte tenu du manque de données sur la dangerosité potentielle des nanoparticules pour l'homme et l'environnement, il serait souhaitable de prendre des mesures concernant :

- l'information des consommateurs sur les produits contenant des nanoparticules manufacturées (nano-produits),
- la limitation de l'exposition des consommateurs et de l'environnement (en plus des salariés),
- l'incitation à la recherche dans les domaines de l'évaluation de l'exposition, de la toxicologie et de l'éco-toxicologie.

Les recommandations suivantes s'appliquent à la fois aux nano-produits déjà sur le marché et aux futurs nano-produits. Par ailleurs, on ne considère ici que les nanoparticules manufacturées volontairement introduites dans les nano-produits, et non pas celles émises par la matrice des nano-produits.

Informers les consommateurs pour qu'ils puissent choisir de consommer ou de ne pas consommer des nano-produits. Donner au consommateur la possibilité de s'informer facilement sur la composition des nano-produits. Le groupe de travail recommande ainsi :

- d'envisager un étiquetage compréhensible pour les consommateurs, pertinent et spécifique des nanomatériaux présents dans le nano-produit considéré ;
- aux industriels de produire dès à présent une fiche descriptive des données concernant les nanoparticules utilisées dans leurs nano-produits (concentration, taille, nature, informations disponibles sur la toxicité, *etc.*). Les informations nécessaires devraient être fournies pour les différentes étapes du cycle de vie, notamment par des fiches de données de sécurité correctement renseignées. L'ensemble des fiches descriptives pourrait être disponible sur un seul site internet géré par un organisme public français.

Limiter l'exposition des consommateurs et de l'environnement. Le groupe de travail recommande :

- de construire un cadre normatif permettant de caractériser les émissions de nanoparticules par les produits contenant des nanomatériaux manufacturés sous contraintes d'usage normal et en fin de vie,
- de limiter l'exposition des consommateurs aux produits contenant des nanomatériaux manufacturés ainsi que leur dissémination dans l'environnement, notamment :
 - ceux pour lesquels il existe des produits équivalents en termes de fonction, d'efficacité et de coût ne contenant pas de nanoparticules ;
 - ceux dont l'utilité démontrée serait faible pour les consommateurs, par exemple sur la base d'une analyse socio-économique de type bénéfique/risque ;
 - ceux susceptibles de libérer des nanoparticules ou des espèces chimiques pouvant présenter un risque pour l'homme ou pour l'environnement au cours de leur utilisation, sous contrainte d'usage normal et en fin de vie. Le critère de persistance dans l'environnement doit être également pris en compte, dans l'éventualité d'un impact à long terme.

Faire progresser les connaissances sur l'exposition et la dangerosité potentielle des nanoparticules.

- Le groupe de travail recommande le lancement d'un programme national de recherches spécifiques sur l'évaluation des risques potentiels pour l'homme et pour l'environnement induits par les nanoparticules manufacturées initiales introduites dans les nano-produits et celles susceptibles d'être relarguées réellement par les nano-produits ;
- s'agissant des expositions, le groupe de travail recommande :
 - de mettre au point des méthodes de prélèvement, de détection et de caractérisation des nanoparticules dans les fluides biologiques et dans les différents compartiments environnementaux ;
 - de déterminer le relargage des nanoparticules des nano-produits sous contraintes d'usage et en fin de vie (combustion, mise en décharge, *etc.*) ;
 - d'étudier le devenir et le comportement (agglomération, transports physique et trophique, persistance, *etc.*) des nanoparticules susceptibles d'être relarguées dans l'environnement ;
 - d'évaluer l'efficacité des filières de fin de vie des nano-produits : recyclage, stockage, procédés d'incinération, *etc.*

- s'agissant de l'établissement de tests normalisés, le groupe de travail recommande d'encourager la participation des équipes de recherche françaises à la mise au point de protocoles expérimentaux normalisés, en relation avec les travaux conduits au niveau européen et mondial, concernant :
 - les nanoparticules types à utiliser pour les tests : nanoparticules manufacturées initiales et celles susceptibles d'être émises réellement par les nano-produits (nanoparticules parfaitement caractérisées et stables) ;
 - les méthodologies des tests *in vitro* et *in vivo* ;
 - les méthodes de prélèvement dans les nano-produits et l'environnement (air, eau, sol).

- s'agissant de la dangerosité des nanoparticules, le groupe de travail recommande :
 - de déterminer la toxicité et l'écotoxicité des nanoparticules initiales et celles susceptibles d'être émises réellement par les nano-produits, en termes de relation niveaux d'exposition / effets, pour des doses correspondant à des scénarios d'exposition appropriés ;
 - d'orienter les efforts de recherche sur les points clés identifiés en toxicologie pour les nanoparticules, à savoir la toxicocinétique, la détermination des mécanismes d'actions (permettant notamment la compréhension des interactions entre des nanoparticules parfaitement caractérisées et les biomolécules, nutriments, xénobiotiques) et l'étude des effets *in vivo* liés à des expositions aiguës et multiples incluant les marqueurs de l'inflammation, le stress oxydant et la prolifération cellulaire, avec pour objectif à terme la mise en œuvre de modèles prédictifs de substitution à l'expérimentation ;
 - d'étudier les effets des nanoparticules dans l'environnement au moyen d'organismes présentant des modes d'alimentation différents et en prenant en compte les mécanismes de bioaccumulation, de bioamplification et d'interaction avec les autres contaminants.

- s'agissant de la méthodologie d'évaluation des risques, le groupe de travail recommande :
 - de poursuivre le développement et la conception d'une grille de cotation permettant de calculer un score de risques nano-spécifiques associés à des produits de consommation ;
 - Tenter de définir des nanomatériaux de référence dont l'étude préalable en profondeur faciliterait la caractérisation des nouveaux produits par similitude.

Maisons-Alfort, le 23 novembre 2009

Au nom des experts du CES « Évaluation des risques liés aux agents physiques, aux nouvelles technologies et aux grands aménagements »,

le président du CES



Abréviations

ACV : Analyse du cycle de Vie

ACGIH : *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* - conférence américaine des hygiénistes industriels gouvernementaux

ADN : acide désoxyribonucléique

Afssa : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

Afssaps : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

Ademe : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

ATP : Adénosine triphosphate

BET : Mesure de la surface spécifique (Brunauer, Emmett et Teller)

BEUC : Bureau européen des unions de consommateurs.

BLM : *Biotic Ligand Model* -modèle du ligand biotique

BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive

BPL : Bonnes pratiques de laboratoire

CE_x : concentrations effectives induisant x % de l'effet observé

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique

Cerege : Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CPP : Comité de la Prévention et de la Précaution

DiGITIP : Direction générale de l'industrie, des technologies de l'information et des postes

DL_x : Dose létale x, dose qui cause la mort de x % d'un groupe d'animaux d'essai

ECETOC : *European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals*

ERA : Espèces réactives de l'azote

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FDS : Fiche de données de sécurité

FSAI : *Food Safety Authority of Ireland*

HONEC : *Highest Observed No-Effect Concentration* - concentrations maximales sans effet

IARC : *International Agency for Research on Cancer* - Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC)

ICV : Inventaire du cycle de Vie

ICP-MS : *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry* - torche à plasma couplée à la spectrométrie de masse

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

Ineris : Institut National de l'Environnement industriel et des Risques

Inserm : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IRSST : Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail

ISO : *International Standardization Organization* - organisation internationale de normalisation

LDH : lactate déshydrogénase

LOEC : *Lowest Observed Effect Concentration* - plus faible concentration pour laquelle un effet significatif est observé

MET : microscopie électronique en transmission

NIOSH : *National Institute for Occupational Safety and Health* – Institut national pour la sécurité et la santé au travail (États-Unis)

NOEC : *No Observed Effect Concentration* - plus forte concentration sans effet significatif observé

NP : Nanoparticules

NTC : nanotube de carbone

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OMNT : Observatoire des Micros et Nano Technologies

OMVPE : *OrganoMetallic Vapor Phase Epitaxy* - épitaxie en phase vapeur d'organométalliques

ONG : Organisation non gouvernementale

PCN : Point de charge nulle

PM 2.5 : *Particulate Matter* - particules de taille aérodynamique inférieure à 2,5 micromètres

PNEC : *Predicted No Effect Concentrations* - concentration sans effet prévisible pour l'environnement

PEC : *Predicted Environmental Concentration* - concentration environnementale prédictive

pH : potentiel Hydrogène

RIVM : *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu* – Institut national pour la santé publique et l'environnement

RNMP : Réseau Nouveaux Matériaux et Procédés

RNS : *Reactive Nitrogen Species* - espèces réactives de l'azote

ROS : *Reactive Oxygen Species* - espèces réactives de l'oxygène

SAS : *Synthetic Amorphous Silica* - silice amorphe synthétique

SNC : Système nerveux central

TGD : *Technical Guidance Document* (manuel technique d'évaluation du risque chimique commun à l'Union Européenne)

UCO : Université Catholique de l'Ouest

UIOM : Usine d'incinération d'ordures ménagères

UMR : Unité Mixte de Recherche

US EPA : *United States Environmental Protection Agency* – Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis

UV-A, UV-B : rayonnements ultraviolets A - rayonnements ultraviolets B

WWI : *Woodrow Wilson Institute*

Définitions

Produit fini : produit de consommation courante, bien de consommation.

Particule d'exposition : la particule à laquelle l'homme ou l'environnement est exposé.

Matrice du produit fini : phase du produit fini qui contient les nanomatériaux.

Nano-produit : produit contenant des nanomatériaux manufacturés.

Entrant : élément de base - ici poudre nanostructurée - utilisé pour fabriquer un produit fini.

Sortant : résidu émis lors de l'usage, du vieillissement ou de la fin de vie d'un produit fini ; peut être en partie nanostructuré, notamment s'il est issu d'un produit fini nanomanufacturé.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quantité de nanoparticules mises en œuvre en fonction des applications détaillées. Document établi à partir des différents tableaux issus du rapport 2009 du RIVM. Sont fournis les éléments non exhaustifs pour l'état actuel et l'état projeté dans un futur proche (2010-2015). Est également fourni le coût de la matière première par kilogramme de nanoparticules considérées.	30
Tableau 2 : Récapitulatif synthétique des avantages et inconvénients des outils méthodologiques analysés.	54
Tableau 3 : Analyse des masses et concentrations massiques en nano-argent dans différents échantillons de produits (d'après T.M Benn. et P.Westerhoff, 2008)	65
Tableau 4 Concentrations de titane (Ti élémentaire) dans des poussières fines (PM _{2.5}) prélevées à l'intérieur des voitures, à côté des routes et dans un site urbain loin des routes. Les chiffres sont indiqués en nano-grammes par mètre-cube (ng/m ³ , 1 µg = 1000 ng) (Riediker M., 2003).	83
Tableau 5 Approximation d'une concentration en nanoparticules de TiO ₂ à partir des émissions de poussières de travaux.	83
Tableau 6 : Description des 8 types de nanoparticules de TiO ₂ testées par Theogaraj <i>et al.</i> (Theogaraj E., 2007) pour l'évaluation de la photo-clastogénicité.	89
Tableau 7 : Génotoxicité et photogénotoxicité <i>in vitro</i> de nanoparticules de TiO ₂ enrobé (mélange Rutile/Anatase) PSMA 1.....	90
Tableau 8 : Génotoxicité et photogénotoxicité <i>in vitro</i> de particules de TiO ₂ anatase PSMA 3.	91
Tableau 9 : Caractéristiques des nanoparticules industrielles présentes dans la crème solaire étudiée (d'après www.tayca.co.jp)	98
Tableau 10 : Description des 8 types de nanoparticules de TiO ₂ testées par Theogaraj <i>et al.</i> (2007) pour l'évaluation de la photo-clastogénicité.....	103
Tableau 11 : Résultats des essais <i>in vitro</i> de génotoxicité de PSMA1 : nanoparticules TiO ₂ (rutile/anatase enrobées)	103
Tableau 12 : Résultats des essais <i>in vitro</i> de génotoxicité de PSMA2, PSMA 4, PSMA 5 et PSMA 6 : nanoparticules TiO ₂ (rutile enrobées ou non).....	104
Tableau 13 : Résultats des essais <i>in vitro</i> de génotoxicité de PSMA2, PSMA 4, PSMA 5 et PSMA 6 : nanoparticules TiO ₂ (rutile enrobées ou non) (suite).....	105
Tableau 14 : Résumé des essais de toxicologie des SAS après traitements aigus ou réitérés (d'après ECETOC, 2006)	186
Tableau 15 : Conclusion des essais de génotoxicité des SAS (d'après OCDE-SIDS, 2004).....	190
Tableau 16 : Résumé des essais de cancérogenèse et de reprotoxicité des SAS (d'après ECETOC, 2006)	193
Tableau 17 : Etudes de toxicité pour le développement de 2 SAS (d'après ECETOC, 2006).....	195

Liste des figures

Figure 1 : Evolution du nombre de nano-produits répertoriés au niveau mondial dans le cadre du <i>Nanotech Project</i> mené par le <i>Woodrow Wilson Institute</i>	23
Figure 2 : Répartition des nano-produits par catégories (25 août 2009, extrait du <i>Woodrow Wilson Institute</i>)	24
Figure 3 : Répartition des nano-produits en sous-catégories de Santé et Fitness : Cosmétiques, Habillement, Produits de soin personnel, Articles sportifs, Crèmes solaires, Filtration (25 août 2009, extrait du <i>Woodrow Wilson Institute</i>).....	25
Figure 4 : Répartition des nano-produits par secteur géographique d'origine : Etats Unis, Asie (Chine, Taiwan, Corée du Sud et Japon), Europe (Royaume Uni, France, Allemagne, Finlande, Suisse, Italie, Suède, Danemark et Pays Bas), Reste du monde (incluant Australie, Canada, Mexique, Israël, Nouvelle Zélande, Malaisie, Thaïlande, Singapour, Philippines), extrait du <i>Woodrow Wilson Institute</i> . 26	
Figure 5 : Classement des nano-produits par nature chimique du nanocomposant.....	27
Figure 6 : Production nationale française de nanoparticules (en fonction de leur nature chimique). En encadré la production mondiale (selon rapport Afsset, Juillet 2008).....	27
Figure 7 : Classification des nanomatériaux selon leur localisation au sein du composant / objet / produit considéré (Hansen S.F., 2007).	37
Figure 8 : Historique partant de la fabrication de l'entrant et s'achevant à la fin de vie de l'article.....	39
Figure 9 : Peut-on établir un lien direct entre l'entrant et les produits émis lors de l'usage et de la fin de vie du produit ?	39
Figure 10 : Nombre de produits finis par domaine application (marché français, 2008).....	46
Figure 11 : Nombre de produits par type de matrice (marché français, 2008)	46
Figure 12 : Distribution de la nature chimique du nanomatériau parmi les 7 types retenus en fonction des domaines d'application (marché français, 2008).....	47
Figure 13 : Schéma explicatif du modèle de gestion des risques <i>Nano Risk Framework</i>	53
Figure 14 : Bio cinétiques de particules de taille nanométrique (d'après Oberdorster G., 2005).	59
Figure 15 : Voies de génotoxicité primaires et secondaires impliquées dans la cancérogénicité des particules (D'après (Schins R.P.F., Knaapen A.M.,2007).....	60
Figure 16 : Mécanismes indirects qui peuvent conduire à la génotoxicité (d'après Singh N., 2009).....	61
Figure 17 : Vue par MEB de nanoparticules d'argent intégrées à des chaussettes (Benn T.M., Westerhoff P.,2008).....	64
Figure 18 : Mécanisme possible de toxicité des nano-argent (Asharani P.V., 2009)	71
Figure 19 : Création de la paire électron \bar{e} / trou h_i^+ suite à l'irradiation par un faisceau lumineux d'énergie ($h\nu$) supérieure ou égale à la différence entre l'énergie de la bande de conduction (E_c) et la bande de valence (E_v).	78
Figure 20 : réactions d'oxydation et de réduction pouvant avoir lieu en surface de TiO_2	79
Figure 21 : Différentes formes de silice avec le numéro CAS (d'après JACC 51).....	109

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

Les nanomatériaux sont constitués de structures élémentaires dont au moins une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nanomètres. Cette caractéristique dimensionnelle, domaine intermédiaire entre la taille des atomes et celle des matériaux massifs, confère à ces matériaux des propriétés ou des comportements particuliers. En effet, à cette échelle, les lois de la physique quantique s'expriment de façon prépondérante. En raison des nombreuses applications innovantes que laissent entrevoir ces propriétés physiques, chimiques ou biologiques, les nanomatériaux représentent un domaine de la recherche scientifique et technique en pleine expansion.

Champ d'expérimentation et de recherche dans le monde depuis une vingtaine d'années, leurs utilisations ne se confinent plus aux seuls laboratoires. Les nanomatériaux interviennent désormais dans de nombreux procédés industriels et participent à la composition d'une grande variété de produits de la vie courante (crèmes solaires, textiles, aliments, transports, *etc.*). On distingue les nanomatériaux fabriqués intentionnellement de l'ensemble des particules également de tailles inférieures à 100 nm mais présentes dans le milieu ambiant naturel ou issues involontairement de divers processus industriels ou domestiques non destinés à la fabrication ou à l'utilisation de nanomatériaux (particules ultrafines).

Le champ d'application des nanomatériaux est loin d'être spécifique à un secteur industriel en particulier. Celui-ci concerne déjà une large variété de produits et d'applications appelée à s'étendre dans des secteurs aussi variés que le bâtiment, l'automobile, l'emballage, la chimie, l'environnement, l'énergie, la santé, la cosmétologie, l'alimentation, *etc.*

Cet essor rapide pourrait entraîner une augmentation de l'exposition de la population aux nanomatériaux manufacturés, concernant en premier lieu les employés de l'industrie et des laboratoires ou les populations riveraines des installations industrielles, pour lesquelles le risque de contact chronique avec les nanomatériaux est en effet le plus élevé : les quantités rencontrées sont les plus importantes et la manipulation quotidienne pour certains. Enfin, dans certaines étapes de production, un certain nombre de nanomatériaux « bruts » se présentent sous forme de poudre dépourvue de toute matrice, impliquant d'importants risques potentiels d'inhalations. Cet aspect de l'exposition professionnelle a fait l'objet d'une saisine précédente de l'Afsset.

Aujourd'hui, la large diffusion de ces nanomatériaux à travers une multitude de produits de consommation courante amène cependant à s'interroger sur un autre aspect de l'exposition aux nanomatériaux manufacturés : celle des consommateurs et de la population générale. Ces expositions, ainsi que la dispersion environnementale consécutive à leur consommation, se révèlent encore plus complexes à évaluer aussi bien qualitativement que quantitativement, pour de multiples raisons : faible traçabilité des nanomatériaux dans les produits disponibles à la consommation et exhaustivité de ces produits, scénarios de consommation et d'exposition à définir, difficulté de la mesure de l'émissivité des produits en fonction de leurs diverses utilisations possibles, *etc.*

Le risque est fonction de deux facteurs distincts que sont l'exposition (des personnes et de l'environnement) et la dangerosité (respectivement en termes de toxicité et d'écotoxicité). Malheureusement, ces deux paramètres sont encore généralement assez mal connus dans le cas des nanoparticules.

Ainsi, pour le facteur « exposition », les données scientifiques ne sont que partiellement disponibles, notamment les scénarios d'utilisation des nano-produits et la faculté des nanomatériaux à émettre des nanoparticules au long de leur cycle de vie : c'est-à-dire durant leur usage et en fin de vie.

Bien que les études de nano-toxicologie progressent de façon remarquable dans le monde, l'avancée des connaissances sur la dangerosité des nanoparticules est retardée par le caractère multiparamétrique des études. Celles-ci doivent en effet prendre en compte, pour chaque matériaux constitutif des nanoparticules, leur taille, leur forme, leurs charges de surface, *etc.*

Par ailleurs, l'écotoxicologie des nanoparticules est encore un domaine scientifique peu exploré. Il n'est donc aujourd'hui pas possible d'évaluer globalement, et de façon exhaustive, les risques liés à l'introduction des nanomatériaux dans les biens de consommation courante actuels et futurs.

Cette étude de cas s'est donc limitée, à titre d'exemple, à quelques nano-produits de grande consommation pour lesquels un niveau de connaissance suffisant était accessible.

1.2 Objet

En réponse à une première saisine de ses ministères de tutelle en 2005, l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail a réalisé un recueil d'informations scientifiques intitulé « Les Nanomatériaux - Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement ». Ce rapport d'expertise a été remis aux ministères de tutelle et rendu public par l'Afsset en juin 2006.

Dans la continuité de ces travaux, l'Afsset a été saisie le 29 juin 2006 par la Direction générale de la santé, la Direction de la prévention de la pollution et des risques, ainsi que par la Direction générale du travail afin de réaliser une synthèse des évaluations des risques existantes et des moyens mis en œuvre pour garantir la protection des travailleurs, et de faire des recommandations de mesures appropriées pour garantir la protection des travailleurs et des populations riveraines susceptibles d'être exposés à des nanomatériaux manufacturés. En l'absence d'autres outils d'évaluation disponibles et spécifiques aux nanomatériaux manufacturés, l'Afsset a alors proposé d'utiliser une approche qualitative simplifiée des risques pour la santé et pour l'environnement.

Dans ce cadre, l'Afsset a été saisie le 05 juin 2008 par la Direction générale de la santé, la Direction générale de la prévention des risques et la Direction générale du travail pour élaborer et étudier des scénarios d'exposition de la population générale à quelques nanomatériaux manufacturés contenus dans un échantillon de produits mis sur le marché, en prenant en compte les différentes voies d'exposition afin d'évaluer les risques potentiels pour la population générale.

1.3 Modalités de traitement de la saisine

1.3.1 Déroulement de la saisine

Le traitement de cette saisine a été confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Évaluation des risques liés aux agents physiques, aux nouvelles technologies et aux grands aménagements ».

Dans un premier temps, l'expertise a été conduite avec l'aide de quatre experts rapporteurs membres du CES « agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements ». Dans un second temps, pour la partie relative à l'évaluation des risques, compte tenu de la complexité et de la sensibilité de la thématique traitée, l'Afsset a décidé, sur proposition du CES « Évaluation des risques liés aux agents physiques, aux nouvelles technologies et aux grands aménagements » en séance du 9 mars 2009, de constituer un groupe de travail formel rattaché à ce CES et composé d'experts sélectionnés suite à un appel à candidature public.

La participation des experts rapporteurs préalablement sélectionnés s'entendait dorénavant à titre d'experts *intuitu personae* dans le cadre d'un groupe de travail dont la présidence a été confiée à M. Fabrice Nessler (toxicologue – Institut Pasteur de Lille).

La collaboration avec les autres agences sanitaires, suggérée par les ministères de tutelle, s'est formalisée par la nomination de deux rapporteurs, experts à l'Afssaps, auprès du groupe de travail. L'Afssa, elle, a été régulièrement informée de l'avancée des travaux mais le groupe de travail n'a pu profiter de la mise à disposition d'experts de cette agence.

Le groupe de travail s'est réuni pour la première fois le 18 mars 2009 puis huit fois en 2009. Le rapport des travaux du groupe de travail, incluant ses conclusions et des propositions de

recommandations a été présenté au CES « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » le 23 novembre 2009.

La synthèse d'expertise collective a été validée par ce CES, le 23 novembre 2009.

1.3.2 Critères de qualité en expertise

Les travaux d'expertise sont issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Les travaux scientifiques retenus dans ce rapport sont issus :

- de publications dans des revues scientifiques internationales avec comité de lecture,
- de rapports d'études scientifiques,
- de communications lors de congrès et colloques internationaux,

Chaque expert a rédigé une contribution dans son champ de compétences. Certaines parties ont cependant fait l'objet d'une concertation entre plusieurs experts. Les textes ont été ensuite soumis à l'appréciation de l'ensemble du groupe. Les conclusions et les propositions ont été rédigées collectivement par le groupe de travail.

Dans le cas où un expert a jugé nécessaire de consulter une personne extérieure reconnue pour ses compétences, la prise en compte éventuelle des informations fournies est à la seule appréciation de l'expert. Ces informations ne font pas l'objet de mentions spécifiques dans ce rapport.

2 Nanomatériaux et biens de consommation : état du marché

2.1 Définition du marché du consommateur

En l'absence de données disponibles sur le plan national, l'analyse présentée ici décrit le marché mondial des biens de consommations contenant des nanomatériaux.

L'inventaire mis en place par le *Woodrow Wilson Institute* dans le cadre du *NanoTech Project* répertoriait, dans sa dernière mise à jour du 25 août 2009 (cf. Figure 1), plus de 1 000 nano-produits sur le marché, au niveau mondial².

Cet institut est une entité mixte des secteurs privé et public dont un tiers des fonds est versé par le gouvernement des États-Unis.

L'inventaire des produits contenant des nanomatériaux bénéficie de mises à jour régulières. Les produits que l'on retrouve dans cet inventaire satisfont à 3 critères :

1. les produits sont accessibles et peuvent être aisément acquis par les consommateurs ;
2. ils sont identifiés en qualité de « nano-produit » par le producteur (revendication) ou par une autre source de données ;
3. la revendication « nano » du produit apparaît raisonnable.

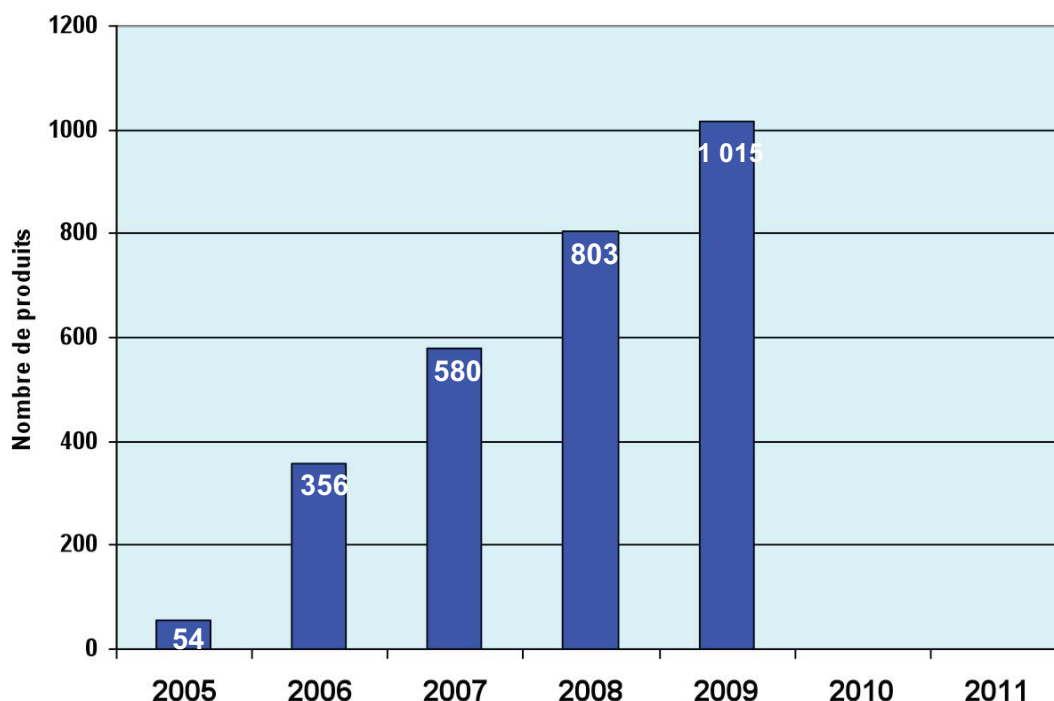


Figure 1 : Evolution du nombre de nano-produits répertoriés au niveau mondial dans le cadre du *Nanotech Project* mené par le *Woodrow Wilson Institute*

Ces nano-produits sont répartis dans les catégories³ suivantes (cf. Figure 2) :

² http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft

- santé et *fitness* : 605 produits ;
- maison et jardin : 152 produits ;
- électronique et informatique : 57 produits ;
- alimentation et boisson : 98 produits ;
- automobile : 68 produits ;
- électroménager : 37 produits ;
- produits pour enfants : 19 produits.

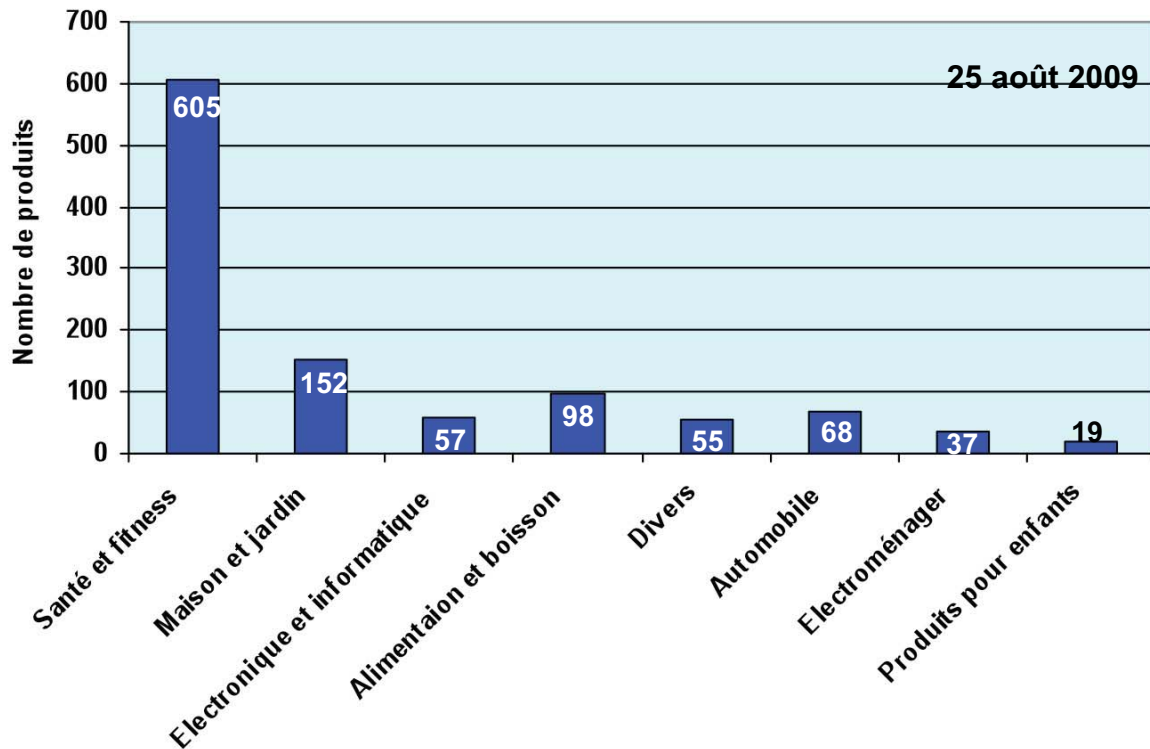


Figure 2 : Répartition des nano-produits par catégories (25 août 2009, extrait du *Woodrow Wilson Institute*)

Pour la catégorie la plus importante (c.à.d. santé et fitness), des sous catégories ont été introduites afin d'obtenir une vue plus précise des applications visées (cf. Figure 3) :

- cosmétiques : 137 produits ;
- habillement : 155 produits ;
- produits de soin personnel : 193 produits ;
- articles de sport : 93 produits ;
- crèmes solaires : 33 produits ;
- filtration eau/air : 43 produits.

³ Il est utile de préciser que, dans cet inventaire, certains produits peuvent appartenir à plusieurs catégories. Par exemple les crèmes solaires destinées aux enfants sont catégorisés « santé et fitness » et « produits pour enfants » à la fois.

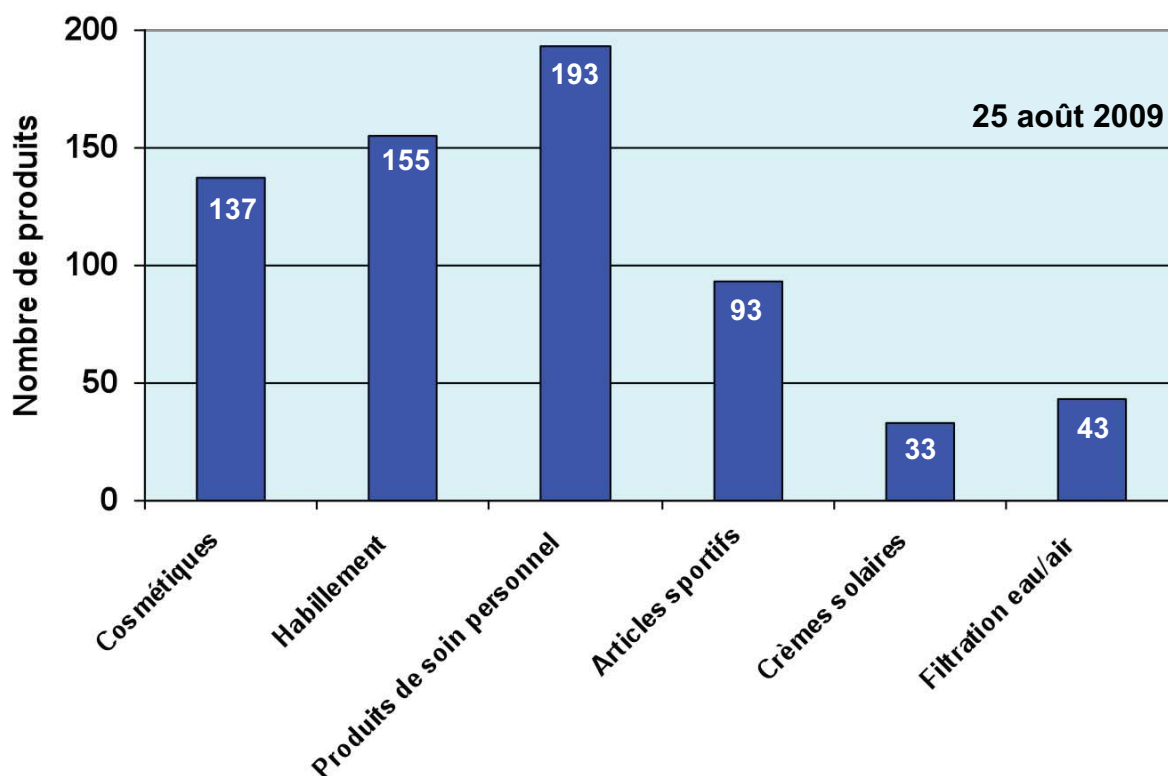


Figure 3 : Répartition des nano-produits en sous-catégories de Santé et Fitness : Cosmétiques, Habillement, Produits de soin personnel, Articles sportifs, Crèmes solaires, Filtration (25 août 2009, extrait du Woodrow Wilson Institute)

Une analyse par pays d'origine des nano-produits est résumée sur la figure suivante (cf. Figure 4). L'inventaire a permis d'identifier 24 pays distincts comme sources commerciales de ces nano-produits. Les États-Unis sont la source la plus importante avec un total de 540 nano-produits, suivis par les pays asiatiques (Chine, Taïwan, Corée du Sud et Japon) avec un total de 240 nano-produits. L'Europe (Royaume-Uni, France, Allemagne, Finlande, Suisse, Italie, Suède, Danemark et Pays Bas) est à l'origine de 154 des 1 015 nano-produits répertoriés à ce jour, alors que pour le reste du monde (incluant Australie, Canada, Mexique, Israël, Nouvelle Zélande, Malaisie, Thaïlande, Singapour, Philippines), 66 nano-produits sont répertoriés.

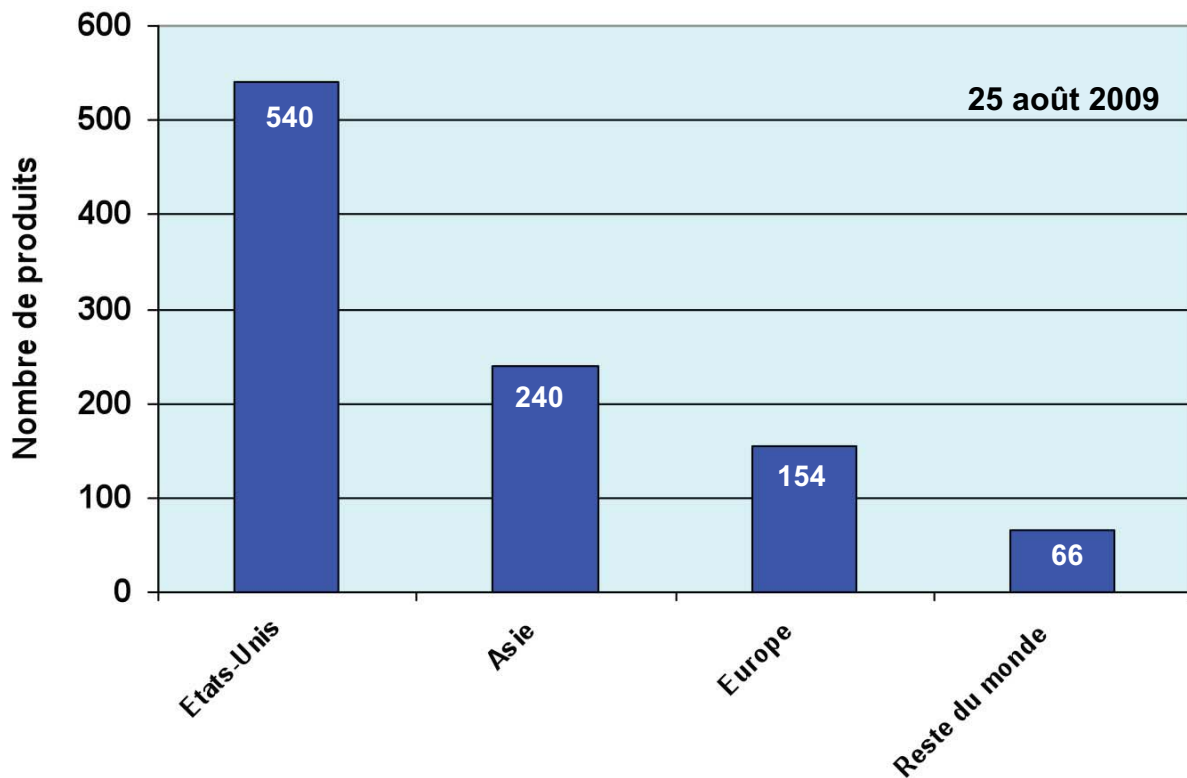


Figure 4 : Répartition des nano-produits par secteur géographique d'origine : Etats Unis, Asie (Chine, Taiwan, Corée du Sud et Japon), Europe (Royaume Uni, France, Allemagne, Finlande, Suisse, Italie, Suède, Danemark et Pays Bas), Reste du monde (incluant Australie, Canada, Mexique, Israël, Nouvelle Zélande, Malaisie, Thaïlande, Singapour, Philippines), extrait du *Woodrow Wilson Institute*.

Enfin, la base de données du *Woodrow Wilson Institute* s'est attachée à classer l'occurrence des nano-produits en fonction de la nature chimique du nano-composant et/ou nano-ingrédient (cf. Figure 5) :

- i) l'argent est le plus répertorié avec près de 259 produits (53,6 %) ;
- ii) le carbone (nanotubes et fullerènes) est le second dans ce classement par nature chimique avec un total de 82 produits (17 %) ;
- iii) le titane (dioxyde de titane inclus) est présent dans 50 produits (10,4 %) ;
- iv) la silice est présente dans 35 produits (7,2 %) ;
- v) le zinc (oxyde de zinc inclus) est présent dans 30 produits (6,2 %) ;
- vi) l'or est présent dans 27 produits (5,6 %).

Il convient de noter que les nano-produits référencés contenant un nano-composant parmi ces 6 familles de natures chimiques les plus utilisées ne représentent que 483 nano-produits sur un total de 1 015. Ce constat souligne l'extrême diversité de la nature chimique des composants à l'échelle nanométrique contenus dans des produits mis sur le marché.

Une telle diversité de la nature chimique des composants nanométriques est soutenue par l'analyse du site maintenu par *NanoWerk*⁴, qui répertorie pour sa part plus de 2 263 types de produits contenant des nanoparticules commercialisées.

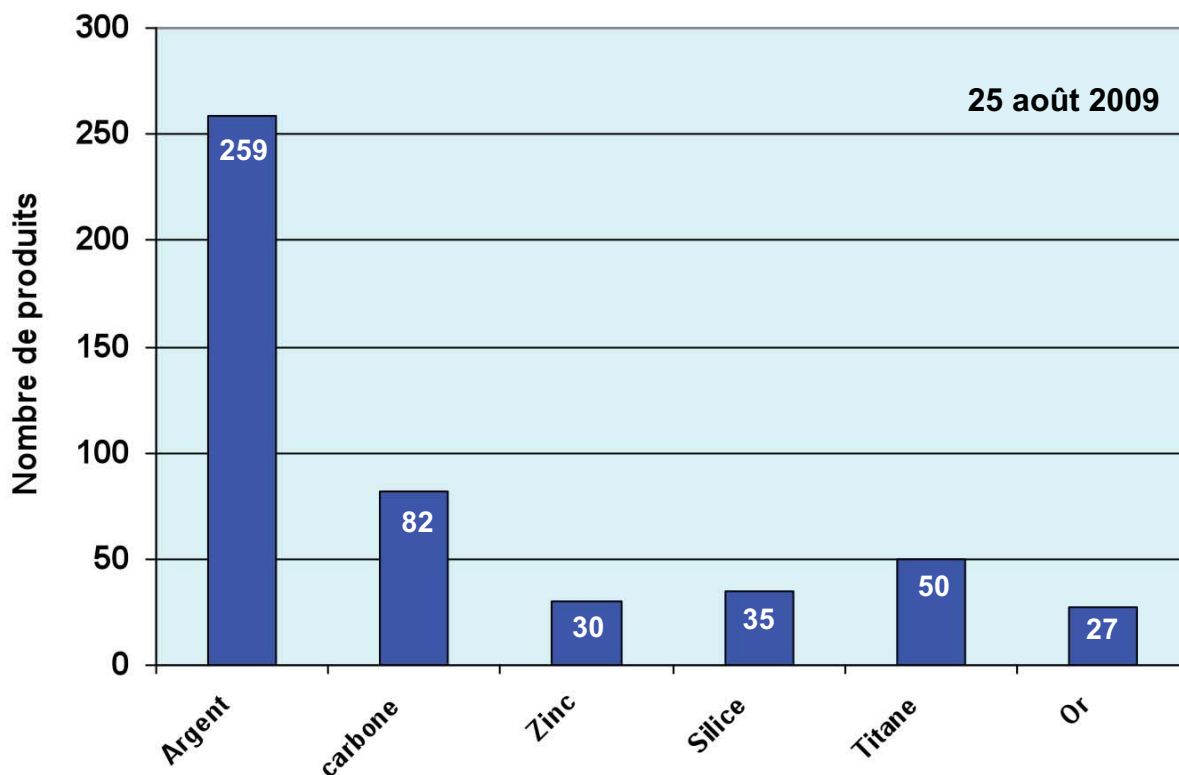


Figure 5 : Classement des nano-produits par nature chimique du nanocomposant

La diversité de la nature chimique des nanocomposants avait déjà été soulignée dans le cadre du rapport de l'Afsset paru en Juillet 2008 (cf. Figure 6) (AFSSET,2008).

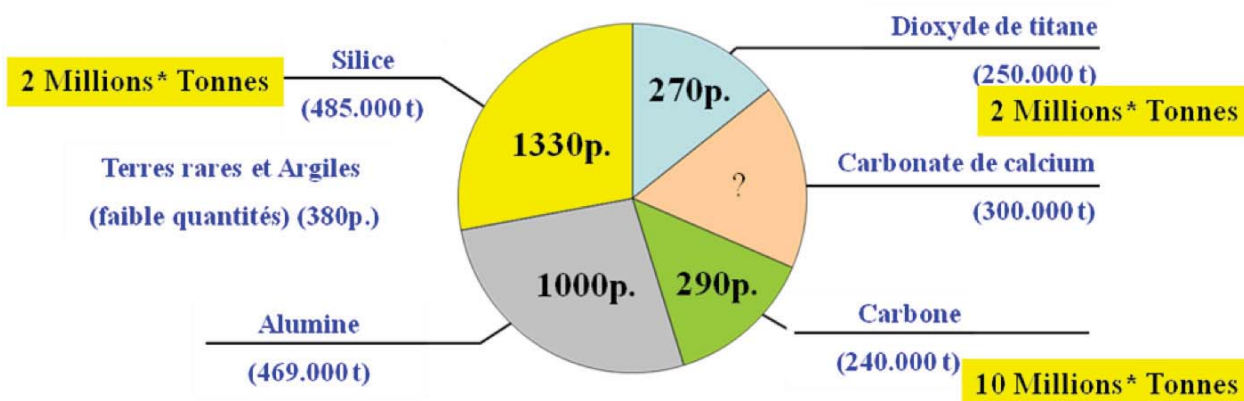


Figure 6 : Production nationale française de nanoparticules (en fonction de leur nature chimique). En encadré la production mondiale (selon rapport Afsset, Juillet 2008)

⁴ http://www.nanowerk.com/phpscripts/n_dbsearch.php

Il convient de citer également un inventaire japonais⁵ pour compléter le panorama des sites et structures réalisant un inventaire des nano-produits (toutes applications confondues) mis sur le marché. L'état de cet inventaire en fonction des catégories prises en compte est le suivant :

- cosmétiques : 388 produits ;
- habillement : 302 produits ;
- électroménager : 43 produits ;
- maison : 157 produits ;
- articles Sportifs : 111 produits ;
- alimentation : 36 produits ;
- culture : 28 produits.

Toujours dans le cadre de l'inventaire des nano-produits mis sur le marché, il existe également un autre site internet, *Nanoshop*⁶ qui identifie les secteurs suivants :

- bâtiments : 40 produits ;
- automobile : 25 produits ;
- articles pour applications marines : 3 produits ;
- textiles : 17 produits ;
- médecine et santé : 34 produits ;
- applications dans le domaine des cosmétiques : 27 produits ;
- électroménager : 12 produits ;
- articles sportifs : 15 produits ;
- maison et Jardin : 37 produits ;
- alimentation : 16 produits ;
- papier et emballage : 4 produits.

En 2009, l'ONG *Environmental Working Group* (États-Unis) identifie pour le seul secteur des produits de soin personnel, près de 9 509 produits contenant des ingrédients de dimension nanométrique⁷.

Une autre source⁸ fait état d'une liste de près de 526 produits pour plus de 264 sociétés, pour les nano-produits revendiquant contenir des nanoparticules d'argent.

Si l'on s'intéresse maintenant de façon plus détaillée au volume de nanoparticules mis en jeu par champ d'applications concernées et par nature chimique des nanoparticules impliquées, le Tableau 1 ci-après s'appuyant sur le rapport publié en 2009 par l'institut national pour la santé publique et l'environnement hollandais (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu –RIVM*) permettra de fournir un certain nombre d'éléments (RIVM,2009).

Il conviendra cependant d'apprécier avec prudence les éléments ainsi condensés, puisque la catégorie correspondant à des quantités supérieures à 10 000 tonnes n'est pas suffisamment

⁵ <http://staff.aist.go.jp/kishimoto-atsuo/nano>

⁶ <http://www.nanoshop.com>

⁷ <http://ewg.org/node/26565> et <http://ewg.org/node/26564>

⁸ http://www.ec21.com/ec-market/nano_silver.html

précise pour évaluer exactement les quantités réellement mises en jeu. Cela consolide le fait que, pour une application donnée, il existe différents composants avec des quantités très variables. D'autre part, cet inventaire n'est pas exhaustif puisqu'il n'intègre pas par exemple l'utilisation de noir de carbone dans les pneumatiques.

Tableau 1 : Quantité de nanoparticules mises en œuvre en fonction des applications détaillées. Document établi à partir des différents tableaux issus du rapport 2009 du RIVM. Sont fournis les éléments non exhaustifs pour l'état actuel et l'état projeté dans un futur proche (2010-2015). Est également fourni le coût de la matière première par kilogramme de nanoparticules considérées.

Nature chimique	Produits/application	Sous-catégorie de produits	Catégorie de produits	Quantité actuellement produite (t/an)	Part de marché actuelle de la catégorie de produit (%)	Prospective de quantité produite (t/an)	Prospective de la part de marché de la catégorie de produit (%)	Prix / Catégorie \$ / kg
Alumine	Filtres catalyseurs	Filtres catalyseurs	Véhicules à moteur	> 10 000	10 – 20	> 10 000	1 – 10	5 - 500
	Système d'éclairage au xénon	Système d'éclairage	Véhicules à moteur	10 – 100	< 1	10 – 100	< 1	5 - 500
	Système de filtration	Système de filtration et purification de l'eau	Filtration et purification	10 – 100	< 1	100 – 1000	< 1	5 - 500
Alumine (couche mince)	Support d'enregistrement optique	Support d'enregistrement	Informatique et électronique	10 – 100	< 1	10 – 100	< 1	5 - 500
	Encres et pigments	Encres et papiers	Informatique et électronique	NR	NR	NR	NR	NR
Nanotubes de carbone (NTC)	Nouveaux développements de nanotubes de carbone	Ecrans	Informatique et électronique	0	0	1 000 – 10 000	1 – 10	50 - 500
	Nouveaux développements de nanotubes de carbone	Autres textiles	Textiles et chaussures	0	0	100 – 1000	< 1	50 - 500
	électrodes transparentes	Ecrans	Informatique et électronique	0	0	100 – 1 000	< 1	50 - 500
	électrodes transparentes	Energie	Informatique et électronique	0	0	100 – 1 000	< 1	50 - 500
Nanotubes de carbone (NTC) coniques	Nouveaux développements de nanotubes de carbone	Energie	Informatique et électronique	0	0	10 – 100	< 1	50 - 500

Nature chimique	Produits/application	Sous-catégorie de produits	Catégorie de produits	Quantité actuellement produite (t/an)	Part de marché actuelle de la catégorie de produit (%)	Prospective de quantité produite (t/an)	Prospective de la part de marché de la catégorie de produit (%)	Prix / Catégorie \$ / kg
Matériaux composites (inc. NTC)	Equipements sportifs	Equipements sportifs	Equipements sportifs	10 - 100	< 1	100 - 1000	< 1	50 - 500
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
Nano argiles	Emballages alimentaires	Emballages	Produits ménagers	1 000 - 10 000	< 1	1 000 - 10 000	1 - 10	5 - 50
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
Nano argiles (coton)	Câblage et gaine de câble R&D	Composants électroniques	Informatique et électronique	1 000 - 10 000	< 1	1 000 - 10 000	1 - 10	5 - 50
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
Nano argiles, polymère, carbone	Equipement professionnel	Equipement professionnel	Textiles et chaussures	0	0	100 - 1 000	< 1	5 - 50
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
Aérogel de silice	Composants automobiles	intérieur	Véhicules à moteur	1 000 - 10 000	1 - 10	1 000 - 10 000	1 - 10	5 - 50
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
Nano films de silice	Isolants	Matériaux d'isolation	Divers	1 000 - 10 000	1 - 10	>10 000	1 - 10	5 - 50
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
Nanoparticules d'argent	Enrobage de fibre optique	Composants électroniques	Informatique et électronique	1 000 - 10 000	1 - 10	1 000 - 10 000	< 1	5 - 50
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
TiO ₂	revêtements anti microbiens	Assimilé aux produits de santé	Cosmétiques et produits d'hygiène	0,1 - 1	< 1	1 - 10	< 1	5 000 - 50 000
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
TiO ₂ , ZnO	Systèmes de filtration / purification de l'air	Systèmes de filtration / purification de l'air	Filtration et purification	< 0,1	< 1	0,01 - 0,1	< 1	5 - 50
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
Couches minces de TiO ₂	Revêtements photocatalytiques	Produits de nettoyage	Produits ménagers	1 000 - 10 000	1 - 10	1 000 - 10 000	1 - 10	5 - 50
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
Oxydes de cérium	Absorbants UV	Produits cosmétiques solaires	Cosmétiques et produits d'hygiène	1 000 - 10 000	1 - 10	1 000 - 10 000	1 - 10	5 - 50
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
Chrome, cobalt et carbone	Additif pour carburant diesel	Carburants	Véhicules à moteur	NR	NR	NR	NR	NR
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
HAP (hydroxyapatite)	Composant de disque dur	Composants informatiques	Informatique et électronique	1 000 - 10 000	1 - 10	1 000 - 10 000	1 - 10	50 - 500
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50
HAP (hydroxyapatite)	Dentifrices	Hygiène orale	Cosmétiques et produits d'hygiène	0 (en 2008)	0	NR	NR	5 000 - 50 000
				> 10 000	10 - 20	> 10 000	20 - 30	5 - 50

Nature chimique	Produits/application	Sous-catégorie de produits	Catégorie de produits	Quantité actuellement produite (t/an)	Part de marché actuelle de la catégorie de produit (%)	Prospective de quantité produite (t/an)	Prospective de la part de marché de la catégorie de produit (%)	Prix / Catégorie \$ / kg
Oxyde de fer (et aluminium)	Support d'enregistrement magnétique	Support d'enregistrement	Informatique et électronique	1 000 – 10 000	1 – 10	100 - 1000	< 1	50 - 500
	Ferrofluides	Composants électroniques	Informatique et électronique	1 – 10	< 1	1 – 10	< 1	50 - 500
	Ferrofluides	Composants informatiques	Informatique et électronique	1 – 10	< 1	1 – 10	< 1	50 - 500
Nanoparticules de lanthane	Anti-algues	Filtration et purification de l'eau	Filtration et purification	NR	NR	NR	NR	NR
Nanoparticules de lithium	Batteries lithium ion	Energie	Informatique et électronique	0	0	1 000 – 10 000	1 – 10	50 - 500
Film nanométrique de polymère	Revêtement optiques	Produits de nettoyage	Produits ménagers	100 - 1000	< 1	100 - 1000	< 1	5 - 50
	diodes électroluminescentes	Système d'éclairage	Informatique et électronique	0	0	0,1 - 1	< 1	>50 000
Palladium	Filters catalyseurs	Filters catalyseurs	Véhicules à moteur	10 - 100	< 1	10 - 100	< 1	5 000 – 50 000
	Filters catalyseurs	Filters catalyseurs	Véhicules à moteur	10 - 100	< 1	10 - 100	< 1	5 000 – 50 00
Platine	Adhésifs et traitements de surface	Revêtements et adhésifs	Divers	> 10 000	40 - 50	> 10 000	30 - 40	50 - 500
	Ecrans plats	Ecrans	Informatique et électronique	100 – 1 000	< 1	1 000 – 10 000	1 – 10	50 - 500
	Traitement de textile	Traitement de textile	Textiles et chaussures	1 – 10	< 1	1 – 10	< 1	50 - 500
Nanocomposites de polyuréthane / aluminium	propriétés anti-adhésives / anti-abrasives	Produits de nettoyage	Produits ménagers	100 – 1 000	< 1	100 – 1 000	< 1	50 - 500
	diodes électroluminescentes	Système d'éclairage	Informatique et électronique	0	0	0,1 - 1	< 1	>50 000
Rhodium	Filters catalyseurs	Filters catalyseurs	Véhicules à moteur	1 – 10	< 1	1 – 10	< 1	>50 000

Nature chimique	Produits/application	Sous-catégorie de produits	Catégorie de produits	Quantité actuellement produite (t/an)	Part de marché actuelle de la catégorie de produit (%)	Prospective de quantité produite (t/an)	Prospective de la part de marché de la catégorie de produit (%)	Prix / Catégorie \$ / kg
Divers matériaux incluant aluminium, silice, titane, zirconium et carbure de silicium	propriétés anti-adhésives / anti-abrasives	Produits de nettoyage	Produits ménagers	100 – 1 000	< 1	100 – 1 000	< 1	50 - 500
	propriétés anti-adhésives / anti-abrasives	Revêtements	Véhicules à moteur	0	0	100 – 1 000	< 1	50 - 500

2.2 Nanomatériaux dans les biens de consommation

2.2.1 Propriétés des nanomatériaux

Les nanomatériaux, comme cela est décrit dans le rapport « les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement » (AFSSET,2006), présentent de nombreuses propriétés particulières dont les principales sont les suivantes :

- Propriétés mécaniques

L'effet de la nanostructure peut se traduire par un phénomène de superplasticité. Les nanomatériaux peuvent ainsi permettre d'améliorer la résistance des matériaux sans compromettre leur ductilité, car la taille des nanoparticules limite les concentrations de contraintes. Il faut également noter l'effet de renfort dans les composites (absorption d'énergie, déviation des fissures, etc.).

- Propriétés électriques

L'introduction de nanoparticules et/ou de nanotubes peut modifier de façon drastique la conductivité électrique de matériaux réputés isolants, et ce à des taux de charges extrêmement faible, notamment lors de l'utilisation de nanotubes de carbone (NTC).

- Propriétés optiques

Les nanoparticules ont des dimensions inférieures aux longueurs d'onde de la lumière visible (380 – 780 nm), ce qui permet d'améliorer les propriétés optiques de certains matériaux (transparence).

- Propriétés de transfert thermique

L'ajout de nanoparticules peut permettre d'améliorer certaines propriétés avec de faibles fractions volumiques. Par exemple, l'ajout de nanoparticules d'alumine ou d'oxyde de zinc peut modifier la conductivité thermique de fluides caloporteurs (nanofluides).

- Propriétés de barrière

Dans les nano-composites à matrice polymère, l'incorporation d'argile augmente les propriétés de barrière vis-à-vis de l'eau et des gaz du fait de l'augmentation de la distance à parcourir pour les molécules qui diffusent.

- Inflammabilité

L'introduction de lamelles d'argile de taille nanométrique dans une matrice polymère retarde sa dégradation et permet la formation d'une couche superficielle carbonisée qui ne se fracture pas mais forme une nanostructure multicouche de silicate améliorant les propriétés de barrière et de résistance, jouant le rôle d'un isolant et réduisant les émissions de produits volatils issus de la combustion.

- Propriétés magnétiques

L'influence de la dimension des domaines cristallins a un effet très important sur le comportement magnétique des matériaux.

- Propriétés catalytiques

La différence des propriétés catalytiques entre le matériel massif et le nano-matériel manufacturé correspondant est illustrée par l'exemple des nanoparticules d'or. L'or massif n'a pas de propriétés catalytiques particulières. Haruta (Haruta M., 1987) a montré que les nanoparticules d'or dispersées sur un support possédaient des propriétés intéressantes pour la réaction d'oxydation du monoxyde de carbone (CO). Cette réaction est observée pour des nanoparticules d'or inférieures à 5 nm.

2.2.2 Exemples d'utilisations dans les produits de consommation

Parmi les exemples d'utilisation des nanomatériaux manufacturés nous pouvons retrouver les suivants :

Apport d'une fonction autonettoyante ou anti-adhésive de surface : certains revêtements contenant des nanomatériaux manufacturés possèdent une fonction autonettoyante ou antiadhésive à la surface. Par exemple, l'utilisation d'un revêtement en dioxyde de titane d'une épaisseur nanométrique sur des fenêtres autonettoyantes agit par destruction de la matière organique du fait des propriétés photocatalytiques du TiO_2 (sous forme anatase).

Augmentation de la dureté : les revêtements résistants aux rayures peuvent être renforcés par l'utilisation de couches intermédiaires de taille nanométrique (ou de multicouches) entre la couche dure externe et le matériau. Une protection mécanique externe peut ainsi être apportée à des matériaux tendres tels que les polymères, les textiles ou le bois.

Amélioration de la résistance au frottement : des revêtements multicouches à base d'oxynitride de titane (TiON), en particulier, peuvent présenter des caractéristiques intéressantes dans le domaine des outils de coupe.

Amélioration de la qualité des textiles : le progrès de la biotechnologie a permis l'incorporation de l'argent ionisable dans des textiles à usage clinique afin de réduire le risque d'infections nosocomiales ou pour l'hygiène personnelle. Des textiles avec des propriétés dites « respirantes » et une résistance à l'eau ou aux taches ont pu être réalisés grâce à l'amélioration du contrôle de la porosité à l'échelle nanométrique et à la rugosité pour un certain nombre de polymères et d'éléments inorganiques.

Apport d'une fonction antimottante et antiagglomérante : la silice peut être utilisée en tant qu'agent anti-agglomérant et fluidifiant dans les aliments tels que le sel commun.

Absorption des rayons ultraviolets : des nano-particules de dioxyde de titane ou d'oxyde de zinc peuvent être introduites dans des crèmes solaires car elles absorbent et réfléchissent les rayons ultra-violetts tout en demeurant transparentes à la lumière visible.

Réduction de l'inflammabilité : les nano composites argile/polymères présentent notamment des propriétés de barrière vis-à-vis de l'eau et des gaz et permettent de réduire l'inflammabilité des polymères.

Cf. aussi paragraphe 2.1.2 les entreprises françaises dans le contexte mondial du rapport de l'Afsset 2008 : « les nanomatériaux : sécurité au travail » (AFSSET, 2008).

3 Nanomatériaux et cycle de vie

Ce chapitre a pour objectif de définir le champ d'analyse de ce travail d'expertise. Pour ce faire, un certain nombre de définitions sont rappelées : notion de nano-objet, de matériaux nanomanufacturés, d'analyse du cycle de vie (ACV). Puis, à des fins d'illustration de la problématique, deux cas particuliers seront étudiés :

- le vieillissement accéléré d'un produit fini et
- l'état de l'art concernant le nano-argent.

Ces cas seront discutés et permettront de mieux définir notre champ d'analyse.

3.1 Principes et définitions classiques

Les définitions présentées ci-dessous sont extraites d'analyses plus détaillées que le lecteur trouvera dans les documents suivants : (ADEME,2005; AFSSET,2006; AFSSET,2008; INRS,2008; ISO, 2008).

Nano-objets : (ISO, 2008)

Nano-échelle : gamme de taille allant environ de 1 nm à 100 nm.

Nano-objet : élément dont une, deux ou trois dimensions sont à la nano-échelle.

Nanoparticule : nano-objet ayant ses trois dimensions externes à la nano-échelle.

Nanofilms, nanocouches ou nanorevêtements : nano-objet dont une dimension est à l'échelle nano, et dont les deux autres dimensions sont nettement plus grandes.

Nanofibres, nanotubes, nanofilaments ou nanobâtonnets : nano-objet dont deux dimensions externes sont à la nano-échelle, et dont la troisième est nettement plus grande.

Nanomatériaux : (AFSSET, 2006)

Les nanomatériaux peuvent être classés en quatre familles selon leurs formes d'utilisation (cf. Figure 7) :

- matériaux de dimension 0 : matériaux sous forme dispersée, aléatoire ou organisée, comme dans les cristaux colloïdaux pour l'optique ou les fluides magnétiques ;
- matériaux de dimension 1 : matériaux sous forme de nanofils ou de nanotubes ;
- matériaux de dimension 2 : matériaux sous forme de couche mince, comme dans les dépôts d'agrégats ou de revêtements épais obtenus par projection plasma ou voie électrochimique ;
- matériaux de dimension 3 : matériaux sous forme compacte comme dans les céramiques et les métaux nanostructurés.

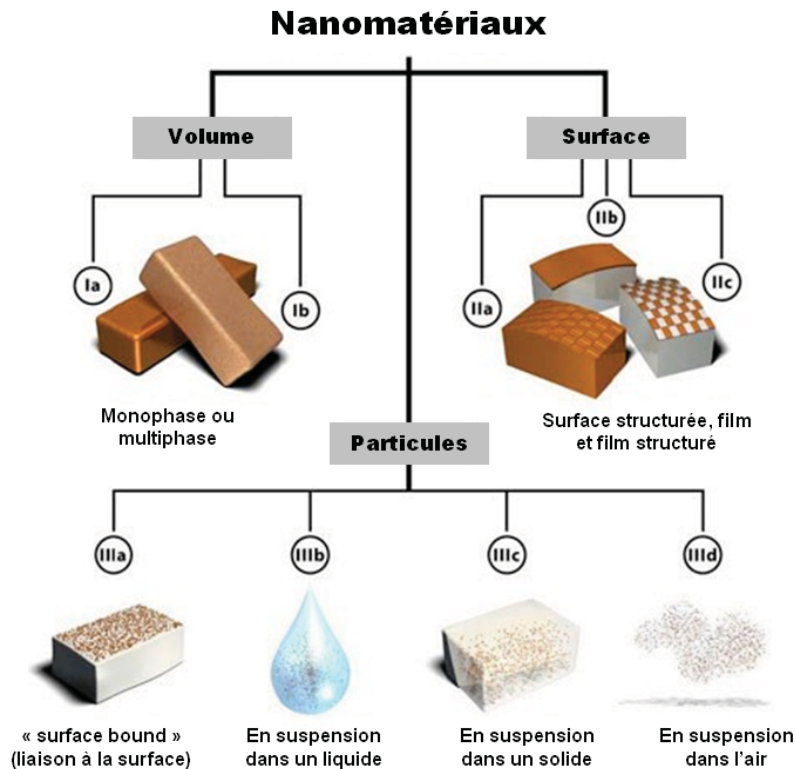


Figure 7 : Classification des nanomatériaux selon leur localisation au sein du composant / objet / produit considéré (Hansen S.F., 2007).

Origine naturelle ou anthropique ; particules intentionnelles ou non-intentionnelles

L'appellation « particules ultrafines » est couramment utilisée pour désigner des particules dont le diamètre est inférieur à 100 nm. Celles-ci sont présentes de manière ubiquitaire dans l'environnement. Elles sont issues soit de sources naturelles (volcans, aérosol marin, émission de composés organiques volatils biogéniques) soit de tout un ensemble d'activités humaines anciennes dans le monde du travail ou dans notre quotidien (procédés industriels tels le soudage, les rejets diesel, les systèmes de cuisson et de chauffage, les fumées de tabac, *etc.*).

L'usage qui est fait généralement du terme « particules ultrafines » s'adresse donc principalement à des sources non-intentionnelles, qu'elles soient naturelles ou anthropiques.

Il en est tout autrement pour les particules associées aux nanomatériaux manufacturés : la présence de particules nanométriques est recherchée en raison de leurs propriétés physicochimiques remarquables.

De fait, l'appellation « nanoparticule » est plutôt réservée aux particules manufacturées et destinées à des usages industriels, que ce soit des nanoparticules connues et produites depuis déjà plusieurs années et dont les tonnages sont élevés ou des nanoparticules nouvelles comme les fullerènes, *etc.* (INRS, 2008). On parle ici de particules « intentionnelles ».

L'analyse de cycle de vie (ACV)

Les méthodes classiques disponibles pour l'évaluation des risques des substances chimiques ne sont pas adaptées aux nanomatériaux et une analyse des risques au cas par cas en prenant en compte tout le cycle de vie apparaît nécessaire. De nombreuses publications envisagent l'analyse de cycle de vie, ou ACV, comme méthode permettant d'évaluer les impacts potentiels des nanotechnologies.

L'ACV a été normalisée par l'Organisation Internationale de Standardisation entre 1997 et 2002 (ISO, 2006; ISO, 2006). L'analyse de l'ACV est une démarche globale et itérative d'évaluation

environnementale proposant une analyse des « impacts » potentiels sur l'environnement et/ou la santé d'un système, d'un service ou d'un produit sur l'ensemble de son cycle de vie, de l'extraction des matières premières à la production de déchets. Les impacts considérés sont notamment le changement climatique, la déplétion de l'ozone stratosphérique, l'épuisement des ressources, la santé humaine, *etc.*

En pratique, la norme ISO 14044 définit quatre étapes :

- (1) le champ de l'étude est défini en précisant le système étudié et l'unité fonctionnelle associée (unité de référence qui permet d'exprimer les impacts sur un élément représentatif et bien caractérisé) ;
- (2) les flux de matières et d'énergies entrants (énergie, matériaux, substances, eau, consommables) et sortants (émissions dans les différents milieux, déchets, énergie) à chaque étape du cycle de vie sont inventoriés (inventaire du cycle de vie : ICV) ;
- (3) puis on procède à une évaluation des impacts potentiels environnementaux à partir de ces données grâce à des coefficients préétablis permettant de calculer la contribution de chaque flux aux divers impacts environnementaux étudiés (effet de serre, acidification, santé humaine, *etc.*). Les résultats sont exprimés par rapport à l'unité fonctionnelle choisie ;
- (4) enfin, les résultats sont interprétés par l'analyse des informations obtenues lors des étapes précédentes, notamment par des analyses de sensibilité afin d'éprouver la robustesse des résultats et de préciser l'étude.

La réalisation des études ACV nécessite un grand nombre de données dont la majorité est manquante pour les nanotechnologies (relation dose-réponse, données d'émission, fraction absorbée, *etc.*). De plus, la complexité des phénomènes en jeu et de leurs interactions est source d'incertitude sur la valeur réelle des impacts sur l'environnement (ex : caractère figé de certaines données utilisées, non prise en compte des effets de synergie ou d'antagonisme entre polluants, des caractéristiques particulières du milieu local, des effets de cinétique, *etc.*) : c'est à ce titre que le qualificatif « potentiel » est utilisé et on parle donc d'« impacts potentiels ». Enfin, il est très difficile d'interpréter les unités utilisées dans les méthodes ACV disponibles et d'évaluer leur pertinence.

L'analyse de cycle de vie définie selon la norme ISO ne peut se substituer à une analyse de risques à chaque étape du cycle de vie.

3.2 Cycle de vie des produits contenant des nanomatériaux : illustration et discussion

3.2.1 Historique du produit :

L'étude des risques liés à un produit suppose le suivi de cet article et de ses résidus tout au long de sa vie (*cf.* Figure 8). Cette démarche est symbolisée par le concept d'analyse du cycle de vie.

Les travaux menés jusqu'ici dans le domaine des nanomatériaux ont porté principalement sur le risque en termes d'hygiène professionnelle (AFSSET, 2008; INRS, 2008). Ceux-ci ont clairement mis en évidence diverses difficultés, à commencer par de fortes limitations au niveau de la mesure de l'exposition (difficulté pour identifier les contributions spécifiques au milieu du bruit de fond), *etc.*

Le thème du présent rapport est de considérer le risque vis-à-vis du consommateur, de la population générale et plus largement de l'environnement, à partir de l'émission éventuelle de nanoparticules issues du produit fini. Nous nous intéressons donc aux risques d'émission de particules (« relargage ») lors de l'utilisation d'un produit de consommation, et lors de sa fin de vie (*cf.* Figure 8)

Des efforts très importants sont menés en termes de recherche en toxicologie et en écotoxicologie. La quasi-totalité de ces travaux porte sur la forme primaire du produit : sur les « entrants », c'est-à-dire la plupart du temps sur les poudres à l'origine du caractère nanostructuré du futur produit fini.

Cette démarche de recherche est complexe, et des efforts notables et stratégiques sont faits notamment par l'OCDE pour normaliser le descriptif de l'entrant ainsi que les procédures expérimentales. Un enjeu majeur est d'assurer la comparabilité des résultats.

Cependant, une question importante se pose d'ores et déjà : quelle est la représentativité de cet entrant au regard des particules potentiellement relarguées à partir d'un produit fini (cf. Figure 9) ?

En effet, le cycle de vie du produit met en évidence des transformations majeures : la fabrication du produit fini est à même de transformer profondément l'entrant. Il en est de même de l'utilisation et du vieillissement du produit, et plus encore de sa fin de vie - on pense par exemple à l'incinération des ordures ménagères.

Cette complexité fait partie intégrante de la définition même de l'ACV. Le chapitre suivant propose une illustration de cette question.

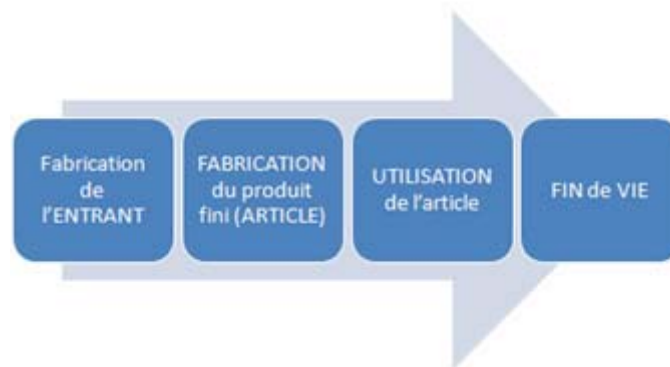


Figure 8 : Historique partant de la fabrication de l'entrant et s'achevant à la fin de vie de l'article.

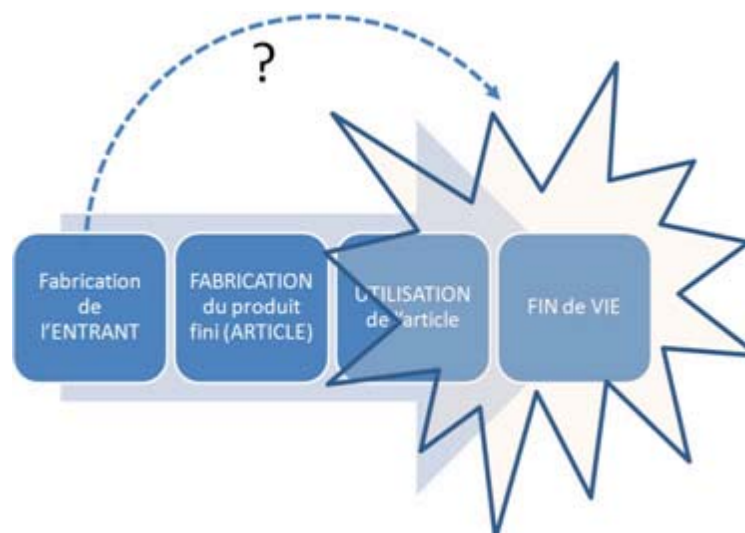


Figure 9 : Peut-on établir un lien direct entre l'entrant et les produits émis lors de l'usage et de la fin de vie du produit ?

3.2.2 Etude de cas : vieillissement accéléré d'un produit fini

S'ils restent peu nombreux, des travaux ont été menés sur les émissions à partir de produits finis nanomanufacturés : produits contenant des nanotubes de carbone (Guiot A., 2008; Le Bihan O.,

Schierholz K.,2008; Le Bihan O., Schierholz K.,2009), du TiO₂ (Hsu L.Y., Chein H.M.,2007), de l'oxyde de zinc (Vorbau M., 2009) .

Une étude a été menée pour évaluer spécifiquement l'impact d'une nanocharge dans un produit fini soumis à un vieillissement (Le Bihan O. et Schierholz K., 2008; Le Bihan O. et Schierholz K., 2009). La structure du produit considéré comprend une couche externe (« vernis »), puis une strate assez fine constituée de fibre de verre mélangée avec une résine contenant des nanotubes de carbone (NTC), et enfin un polystyrène de plusieurs centimètres d'épaisseur.

- le premier résultat marquant est que le ponçage et le perçage d'un échantillon sans NTC induisent une émission de particules et notamment de nanoparticules, de manière significative. La couche externe, à savoir le vernis, est la principale source de particules. Cet exemple illustre parfaitement le fait qu'une émission de particules ou nanoparticules ne nécessite en aucun cas la présence d'un entrant « nano » ;
- la comparaison des deux produits – l'un avec, l'autre sans NTC - a fait apparaître des niveaux d'émission comparables : la nanocharge (minoritaire en masse) de ce produit n'a donc eu aucune influence quantitative sur les émissions ;
- seule une étude plus poussée en termes de prélèvement et d'analyse serait à même de donner des informations quantitatives et qualitatives sur le rôle des NTC.

Compte-tenu du mode de fabrication, et tout particulièrement du mélange des NTC avec une résine, il est très probable que les particules émises soient hétérogènes. En d'autres termes, on ne retrouvera trace des NTC que probablement à travers des débris présents au sein d'un mélange NTC + résine + fibre de verre. Il y a peu de chance de retrouver dans le rejet une nanocharge sous sa forme initiale.

En conclusion, ces résultats suggèrent que :

1. un relargage « nano » peut se faire sans la présence de nanomatériaux manufacturés et ajoutés intentionnellement ;
2. la problématique de l'émission de nanoparticules n'est pas spécifique aux entrants « nano » mais concerne potentiellement toute partie d'un produit ;
3. l'identification dans le rejet des dérivés issus des entrants « nano » peut être très complexe ;
4. ces dérivés ont toute chance d'être éloignés voire extrêmement différents de l'entrant « nano » ; et par ailleurs de n'être qu'une composante d'une particule hétérogène.

Cette étude de cas illustre donc parfaitement la complexité de la question posée.

3.2.3 Etude de cas : état de l'art concernant le nano-argent

Nous considérons ici la démarche très intéressante de Wijnhoven (Wijnhoven S.W.P., 2009). Cette étude est en effet un bilan sur les données disponibles et manquantes pour maîtriser le risque lié aux nanoparticules d'argent (risque pour les personnes et l'environnement).

Cette démarche est à souligner car elle est incontournable pour préparer une analyse de risques sur le cycle de vie.

Elle met en évidence que si de nombreux travaux ont porté sur l'argent, très peu encore ont porté sur son volet « nano ». Du fait de son usage étendu dans de nombreux domaines de production (textiles, cosmétiques, agroalimentaire, etc.), l'étude estime que le nano-argent a de fortes probabilités de parvenir très facilement dans l'environnement aqueux.

Elle souligne également le manque de données concernant le suivi du nano-argent le long de la chaîne de vie : produit → émission → dispersion dans l'environnement → effets sur le biotope. Sur ce point, l'étude conclut qu'il est impossible, faute de données, de prétendre porter un avis sur le

risque pour l'environnement issu de la production et de l'utilisation du nano-argent. L'analyse de risques sur le cycle de vie est donc, de fait, impossible.

De plus, les auteurs constatent que l'étude des voies et efficacités de pénétration dans l'organisme reste à mener pour le nano-argent, et que, de façon plus générale, l'étude de la transposition des connaissances « micro » à l'échelle nano reste à entreprendre.

3.2.4 Discussion

Ces deux exemples montrent à quel point la formulation du problème doit être détaillée avec soin.

Si des appellations telles que « particules intentionnelles / non-intentionnelles » permettent de faciliter la discussion, elles s'avèrent insuffisantes pour classer / différencier les différentes situations.

1. Si l'on prend le cas simple d'un produit pour lequel il existe une revendication « nano », tout ou partie du produit est susceptible de contenir des produits non « nano » pouvant mener à un relargage « nano » ;
2. l'historique du produit met en œuvre différentes transformations qui atténuent fortement le lien entre les entrants nanostructurés et les caractéristiques du rejet du produit fini. La labellisation « *a priori* » ne garantit pas une labellisation « *a posteriori* » ;
3. à l'inverse, l'absence d'une revendication « nano » ne signifie en aucun cas l'absence d'émission de nanomatériaux. Un fabricant peut élaborer des produits sans réaliser que ceux-ci entrent dans le champ de définition des produits intégrant des nanomatériaux. C'est le cas de certaines poudres utilisées depuis de nombreuses années. De la même manière qu'il existe des produits anciens « non-conscients », il existe probablement des développements actuels « non-conscients ».

3.3 Définition du champ d'analyse pour l'étude

Le présent rapport d'expertise a pour objet d'évaluer le risque lié à l'utilisation des produits finis contenant des nanomatériaux manufacturés (risque pour le consommateur et pour l'environnement). Le groupe de travail a choisi de ne pas considérer l'ensemble du cycle de vie d'un produit pour l'évaluation des impacts potentiels, mais de se limiter aux parties « utilisation » et « fin de vie ». Comme cela a été discuté ci-dessus, la problématique est, même dans cette situation réduite, extrêmement complexe. De plus, le volet « production » a été abordé dans le cadre de la saisine précédemment confiée à l'Afsset (AFSSET, 2008). Nous considérerons donc des articles sortis du site de production et mis à la disposition du consommateur dans un point de vente ou qui peuvent être utilisés tels quels par un transformateur dans un produit fini.

L'ensemble de ce chapitre a montré la grande étendue du problème, en termes de variables. Chaque produit considéré génère un haut degré de complexité. Nous avons constaté la relative fragilité de la labellisation « nano ». Par conséquent, dans le cadre de ce rapport, un ensemble réduit de trois produits de consommation pour lesquels le caractère nanométrique et le caractère intentionnel sont incontestables a été choisi.

A ces produits a été ajouté un quatrième produit de consommation, la silice, afin de bénéficier de l'un de ces entrants anciens, très antérieurs à l'émergence de la problématique « nano », pour lesquels il n'y a pas forcément de revendication « nano » explicite.

4 Recensement et sélection des produits

Ce chapitre présente une liste de produits contenant des nanomatériaux manufacturés présents sur le marché français. Le recensement de ces produits a été réalisé à partir d'un inventaire spécifique, axé sur le marché national. Contrairement aux inventaires disponibles (*cf.* chapitre. 2.2) relatifs à un état des lieux à l'échelle mondiale, dont la méthodologie de recherche n'est pas toujours clairement identifiée, ce recensement a fait l'objet de contrôles stricts afin de s'assurer notamment de la présence effective de nanomatériaux dans les produits considérés. La méthodologie de recensement est explicitée ci-dessous.

A partir de cette liste de produits, en constante évolution, des familles de produits contenant les nanomatériaux les plus utilisés ont été déterminées, avant d'opérer la sélection de quatre produits contenant des nanomatériaux, objets des évaluations de risques détaillées décrites dans le chapitre 6.

4.1 Méthodologie de recensement

La majeure partie du travail préliminaire a consisté à recenser des produits finis disponibles sur le marché français et contenant les nanomatériaux manufacturés les plus utilisés. Ce recensement n'a pas eu pour ambition d'être exhaustif, la consultation d'une grande variété de sources de données a été privilégiée par rapport à la quantité de produits recensés. L'objectif attaché à ce travail d'inventaire était de fournir un support pour la sélection de quelques produits qui ont fait ensuite l'objet des évaluations de risque (évaluation des dangers et de scénarios d'exposition).

À ce jour, de nombreuses bases de recensement existent et contiennent une grande variété de produits couvrant de nombreux domaines d'application. Tous ces produits sont aujourd'hui accessibles grâce au réseau internet. Il est en effet possible d'obtenir pratiquement tout type de produit depuis la France, et ceci, quel que soit le pays producteur. Le recensement effectué par les rapporteurs en charge de la première partie du traitement de la saisine se base donc sur la consultation d'un grand nombre de sources de données : sites internet, bases de données, inventaires, organismes, associations, rapports français et internationaux, *etc.* Les efforts se sont particulièrement portés sur les produits disponibles sur le marché français ainsi que ceux produits en France ou dans les pays limitrophes.

4.1.1 Informations recherchées

Pour chacun des produits, les informations qui ont été associées dans la base de recensement sont les suivantes :

- le domaine d'application ;
- l'application ;
- la nature chimique du matériau nanostructuré ;
- le type de matrice (solide, liquide, pâte, aérosol, poudre) ;
- le nom commercial du produit ;
- le nom du producteur et du distributeur si disponible ;
- le pays producteur ;
- la disponibilité du produit sur le marché français ;
- la possibilité de se procurer le produit par l'intermédiaire du réseau internet ;
- la présence d'une revendication « nano » pour ce produit ;
- la nature de la revendication, si elle existe (site internet du producteur, fiche technique, fiche de données de sécurité, *etc.*).

La consultation d'une grande diversité de sources et l'association de la nature de la revendication « nano » pour chacun des produits constituent le point fort de ce recensement. Concernant l'exhaustivité, celle-ci doit surtout concerner les catégories de produits recensés qui permettront de déboucher sur un panel plus large de scénarii d'exposition possibles.

4.1.2 Sources consultées

- *Internet :*

Sites internet des producteurs de produits finis et de nanomatériaux, fiches et dossiers techniques des produits, fiches de données de sécurité des produits ;

Sites spécifiques aux « nano », parmi lesquels nous pouvons citer *nanopedia*⁹, *the web course of nanotechnology* (États-Unis) ;

- *Bases de données ou inventaires :*

L'inventaire des produits de consommation « nano » du *Woodrow Wilson Institute*¹⁰ (États-Unis) ;

La base de données des acteurs des nanomatériaux en France¹¹ développée à l'occasion de l'étude stratégique réalisée par le ministère de l'industrie (DiGITIP) en 2004 ;

L'inventaire des produits et producteurs « nano » : *The Nanotech Product Directory*¹² ;

La base de données *Nano-Shops*¹³ (Allemagne) ;

La base de données *nanoproducts*¹⁴ (*Nanotechnology material database*, Allemagne) ;

Le portail européen *Nanoforum*¹⁵, (*European Nanotechnology Gateway "Nanoproducts in Consumer Products"*) ;

Le portail *Nanowerk*¹⁶ (États-Unis) ;

Le portail *nanotechnology now*¹⁷.

- *Présentation de conférences dans le cadre du Nanoforum du CNAM*¹⁸ :

8 novembre 2007 : Nanomatériaux et ciments ;

6 décembre 2007 : Nanotechnologies et cosmétiques ;

7 février 2008 : Nanotechnologies et alimentation.

- *Rapports :*

Out of the laboratory and on to our plates, nanotechnology in Food & Agriculture, Friends of the earth edition, mars 2008 ;

Small wonder? Nanotechnology and cosmetics, Which (ONG, UK), novembre 2008 ;

Nanowerk consumer product ;

Nanotechnology in Consumer Products, Nanoforum, octobre 2006 ;

⁹ <http://nanopedia.case.edu> ; consulté durant la période juin-décembre 2008

¹⁰ <http://www.nanotechproject.org> ; consulté durant la période juin-décembre 2008

¹¹ <http://www.nanomateriaux.org> ; consulté durant la période juin-décembre 2008

¹² <http://www.nanoshop.com> ; consulté durant la période juin-décembre 2008

¹³ <http://nano-shops.com> ; consulté durant la période juin-décembre 2008

¹⁴ <http://www.nanoproducts.de> ; consulté durant la période juin-décembre 2008

¹⁵ <http://www.nanoforum.org> ; consulté durant la période juin-décembre 2008

¹⁶ <http://www.nanowerk.com> ; consulté durant la période juin-décembre 2008

¹⁷ <http://www.nanotech-now.com> ; consulté durant la période juin-décembre 2008

¹⁸ Compte-rendus des séances du nanoforum disponibles sur le site internet suivant :

<http://www.vivagora.org/spip.php?rubrique56>

Nanomaterials in consumer products, RIVM, avril 2007 ;

Survey of nanotechnological consumer products (ministère danois de l'environnement), 2007.

- *Consultation d'organismes européens*

RIVM (Institut national pour la santé publique et l'environnement, Pays Bas) ;

BEUC Bureau européen des unions de consommateurs.

- *Associations de consommateurs*

Organisation Générale des Consommateurs - OR.GE.CO.

4.1.3 Principales difficultés rencontrées pour le recensement des produits finis contenant des nanomatériaux manufacturés :

La principale difficulté rencontrée lors de l'élaboration de ce recensement a été d'identifier la réalité de la revendication « nano », qui peut être aussi bien « commerciale » que scientifiquement fondée. En effet, en l'absence d'obligations réglementaires sur ce point, il est actuellement impossible d'identifier des produits commercialisés contenant des nanomatériaux manufacturés à partir de notifications ou d'autorisations spécifiques existantes. Enfin, la seule identification des produits amonts (produits intermédiaires) ne permet pas de tracer la totalité de la chaîne de production et d'identifier clairement les applications associées (produits finis). C'est pourquoi le recensement contient aussi bien des produits amont que des produits mis sur le marché et à la disposition du grand public.

Enfin, comme le souligne l'Afssa dans son rapport de mars 2009, intitulé « les nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale » (AFSSA,2009), il est intéressant de noter que les interrogations grandissantes au niveau international sur les risques liés aux nanotechnologies se sont traduites par la disparition de la référence à ces nanotechnologies sur certains supports de communication (sites de producteurs, fiches techniques, etc.). Ce phénomène a pu parfois être observé au long du recensement des produits finis dans le cadre des travaux de l'Afsset.

Au-delà du problème lié à l'identification des produits contenant des nanomatériaux manufacturés, les données permettant de caractériser le nanomatériau, lorsqu'elles sont disponibles, s'avèrent le plus souvent imprécises. En effet, même si la revendication recherchée est parfois disponible, il est fréquent de ne pouvoir identifier la nature chimique ou la forme du nanomatériau en question ou encore d'en déterminer les quantités présentes dans le produit. Ces données, quant elles existent, doivent d'ailleurs être considérées avec prudence, leur exactitude pouvant être remise en question. Pour illustrer la difficulté à trier ces revendications, nous pouvons nous reporter à une étude menée par un laboratoire spécialisé dans la caractérisation des produits réputés pour contenir de l'argent, le *Colloidal Science Laboratory, Inc.*, indiquant que la revendication « nano-argent » ne signifie pas une teneur en argent certifiée. Dans certains cas, cette étude a même montré que des produits se revendiquant comme contenant du « nano-argent », ne contenaient pas d'argent¹⁹. Cette étude a démontré non seulement que la quantité d'argent pouvait être remise en question, mais aussi que la revendication même de la présence d'argent sous forme nanoparticulaire était à questionner.

4.1.4 Résultat du recensement

Ce travail n'a pas été réalisé dans le but d'aboutir à un inventaire exhaustif des produits finis contenant des nanomatériaux manufacturés, en raison des motifs exposés précédemment. En revanche, cet inventaire s'attache à présenter toutes les catégories de produits contenant des nanomatériaux et les types de nanomatériaux (nature chimique) présents sur le marché français. Au final, un total de 246 produits finis disponibles sur le marché français en 2008 a été recensé. Ce nombre est évidemment en évolution constante.

¹⁹ <http://www.silver-colloids.com/Reports/reports.html>

Les nanomatériaux pour lesquels le groupe de travail a pu identifier des produits finis ou intermédiaires sont les suivants :

- Argent ;
- Argile ;
- Biopolymères ;
- Carbonate de calcium ;
- Carbonate de potassium ;
- Céramique ;
- Dioxyde de titane ;
- Fluoro-carbone ;
- Fluoropolymères ;
- Fullerène ;
- Latex ;
- Nanotubes de carbone (NTC) ;
- Or ;
- Oxyde d'aluminium ;
- Oxyde de cérium ;
- Oxyde de zinc ;
- Oxyde de zirconium ;
- Platine ;
- Résine acrylique ;
- Silicate d'aluminium ;
- Silice.

La répartition des usages de ces 246 produits disponibles sur le marché français en 2008 est résumée dans les Figure 10 et Figure 11. Il convient de considérer avec prudence cette hiérarchisation, compte-tenu du caractère non exhaustif de l'inventaire.

La catégorie « applications multiples » regroupe les produits intermédiaires destinés à la production de biens de consommation dont seules les multiples catégories d'applications (par opposition aux produits finis) sont identifiées. De fait le poids de cette catégorie vient encore relativiser ce recensement.

La répartition des mêmes produits en fonction cette fois-ci du type de matrice conditionnant le nanomatériau dans le produit fini (Figure 11) révèle l'ampleur de l'imprécision des indications accompagnant la description de ces articles commerciaux. En effet, pour environ le quart des produits identifiés (24 %), ce critère est indéterminé.

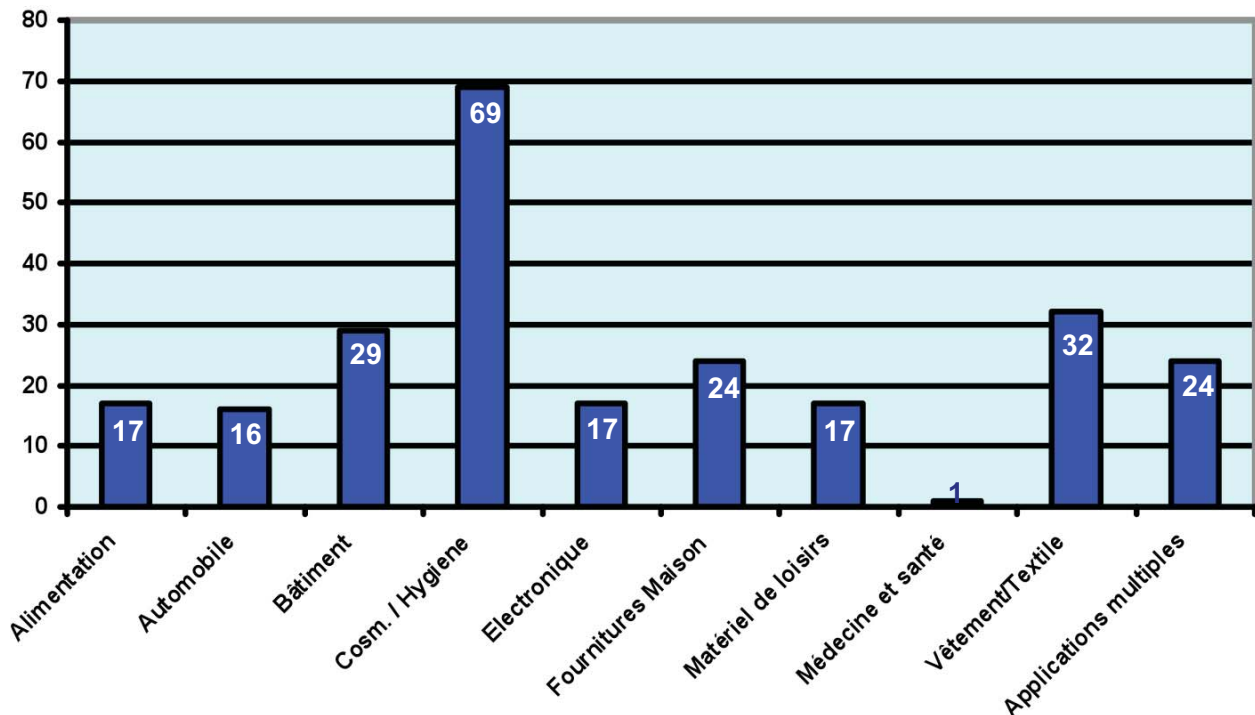


Figure 10 : Nombre de produits finis par domaine application (marché français, 2008)

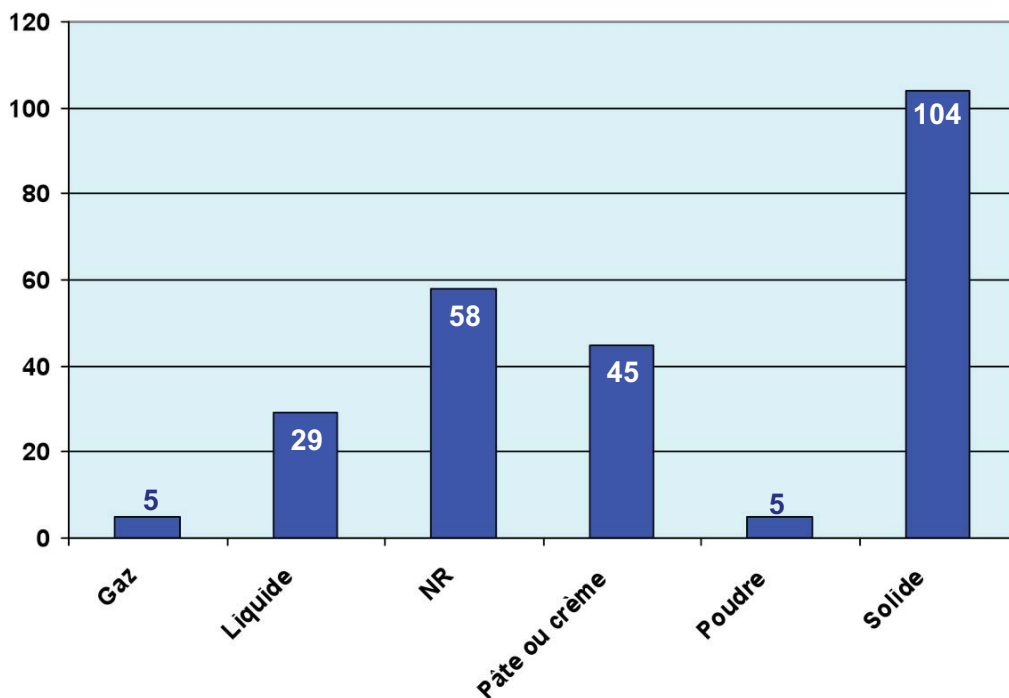


Figure 11 : Nombre de produits par type de matrice (marché français, 2008)

NR : Non renseigné

4.2 Sélection des produits

Le groupe de travail a étudié quelques produits finis contenant des nanomatériaux manufacturés afin d’élaborer des scénarios d’exposition, en considérant les dangers nano-spécifiques associés à ces nanomatériaux, et d’aboutir à une évaluation qualitative des risques.

Les propriétés des nanomatériaux varient selon leur composition chimique, leur taille, leur surface spécifique, l'état de surface, ou encore la forme de la nanoparticule considérée, *etc.* De plus, chaque nanomatériau peut être doté d'une réactivité ou d'un comportement différent selon la formulation et la matrice du produit fini considéré qui le contient. Ainsi, pour ces raisons, il est apparu peu réaliste de travailler sur une famille de produits (*i.e.* : les crèmes solaires) et le groupe de travail a donc choisi de considérer une sélection de références commerciales (un type et une marque de produit bien précis), chacune ayant une formulation ou une matrice différente et unique.

La méthodologie associée à la sélection de ces références commerciales est la suivante : sept nanomatériaux d'intérêt, parmi les plus utilisés (en termes de nombre d'applications commerciales), ont d'abord été sélectionnés dans le recensement :

- Oxyde de titane ;
- Argent ;
- Silice ;
- Oxyde de cérium ;
- NTC ;
- Oxyde de zinc ;
- Fullerènes.

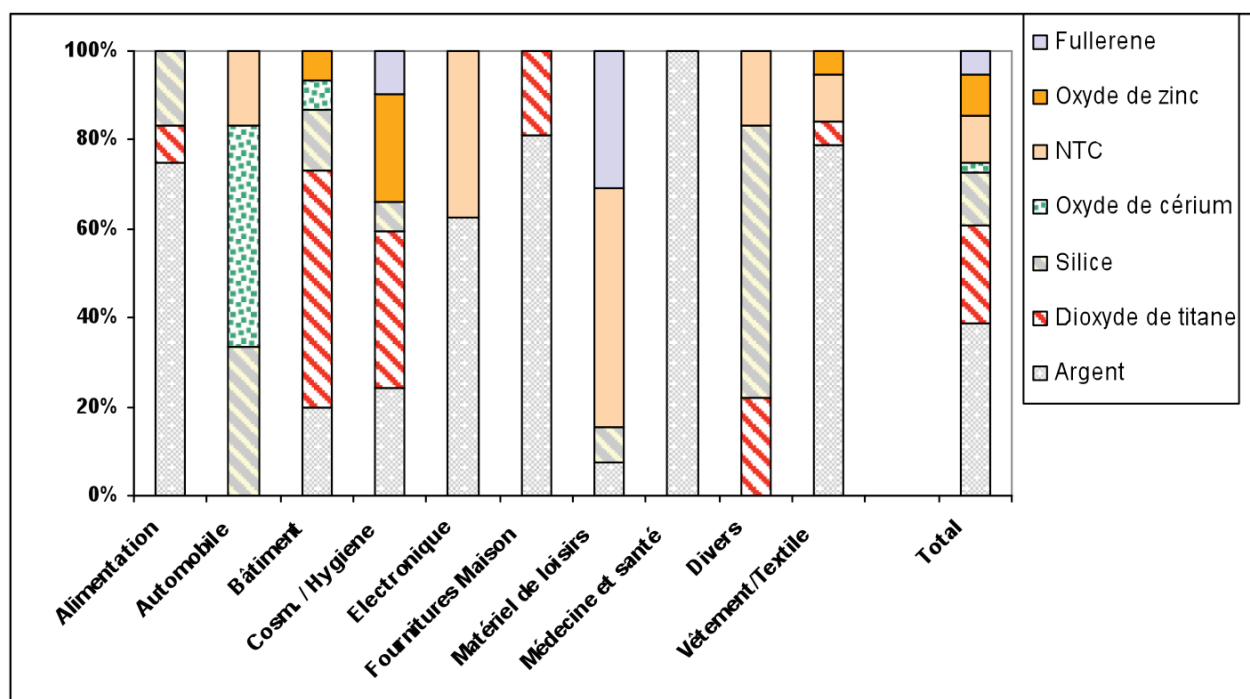


Figure 12 : Distribution de la nature chimique du nanomatériau parmi les 7 types retenus en fonction des domaines d'application (marché français, 2008).

Trois catégories de produits, jugées d'intérêt par le groupe de travail dans le cadre de l'exposition/dispersion des nanomatériaux, ont alors été sélectionnées pour chaque nanomatériau cité ci-dessus. Un ensemble suffisamment large a en effet permis aux experts de réaliser une sélection des produits finis les plus pertinents à étudier pour réaliser une analyse du risque. L'élaboration de cette présélection n'a pas donné lieu à un cadrage méthodologique rigide de hiérarchisation ou de sélection. En effet, l'ensemble des choix effectués s'est principalement basé sur la disponibilité des données et donc la possibilité de construire un scénario d'exposition pour le produit fini considéré.

Par la suite, une présélection de produits finis contenant un ou plusieurs des sept nanomatériaux d'intérêt cités ci-dessus a été réalisée. Afin de réaliser ensuite une évaluation des risques, quatre produits finis ont ensuite été sélectionnés sur la base des critères suivants :

- les données relatives au produit fini sont accessibles, sa présence est validée dans le recensement ;
- il existe une revendication « nano » formelle ou déduite²⁰ ;
- le type de produit fini est largement utilisé et connu du public ;
- l'ensemble des produits sélectionnés permet au groupe de travail de considérer les différentes voies d'exposition (ingestion, inhalation et cutanée, avec seule considération de l'exposition directe et non accidentelle) ;
- les produits considérés disposent de matrices différentes (liquide, solide, poudreux) ;
- l'exposition aux nanomatériaux est considérée comme l'exposition directe.

La sélection des produits finis aurait pu être réalisée en considérant les tonnages associés à la fabrication de ces produits, de manière à cibler les utilisations *a priori* majeures et donc les plus préoccupantes. Le RIVM, qui a publié un rapport en 2009 intitulé « *Exposure to nanomaterials in consumer products* » (RIVM, 2009), a étudié quatre rapports d'analyse de marché publiés entre 2006 et 2008. Le but principal était d'identifier les produits pertinents à usage grand public contenant des nanomatériaux manufacturés. Les données issues de ce travail de synthèse, non chiffrées, sont des estimations. Ainsi, les données de consommation et de production ont été estimées par catégories de produits. Cependant, aucune information sur des produits spécifiques ou encore sur des références commerciales précises n'est disponible dans ce rapport. Par conséquent, le mode de classification des catégories de produits en fonction des masses globales de nanomatériaux produites annuellement associées ne prend pas en compte les spécificités des produits finis telles que les concentrations du ou des nanomatériaux intégrés. Une telle hiérarchisation ne peut donc pas rendre compte à elle seule de la pertinence de l'exposition à un article.

La faible accessibilité aux données propres à des références commerciales précises rend la priorisation des produits par rapport aux critères principaux pour l'évaluation de l'exposition difficile, voire impossible. Le choix des produits finis faisant l'objet d'études détaillées a été alors arrêté après une réflexion collective du groupe de travail. Enfin, il faut noter que, dans le cadre de cette étude, les données de marché viennent conforter la sélection qui s'est faite sur les critères précédemment évoqués en début de chapitre.

4.3 Résultat du choix des produits

Pour des raisons de respect de la confidentialité, les noms commerciaux des produits ainsi que les noms des producteurs associés ne sont pas donnés.

Les produits retenus pour l'étude d'évaluation des risques, sur la base des critères précédemment identifiés, sont les suivants :

- **produit A** : chaussettes antibactériennes, de marque A1, dans la catégorie « textile ». La voie d'exposition considérée est la voie cutanée. Diverses propriétés, dont celles antibactériennes et anti-fongiques et anti levure correspondent aux propriétés attendues des nanoparticules d'argent incorporés dans le produit A ;
- **produit B** : ciment, de marque B1, dans la catégorie « bâtiment ». La voie d'exposition considérée est la voie respiratoire. La spécificité revendiquée par le producteur de ce type

²⁰ Certaines informations révélées par le producteur du produit impliquant nécessairement des propriétés de structure nanométrique (par exemple importantes surfaces massique mesurées pour des poudres mesurées par BET) sont considérées comme des revendications déduites du nanomatériau

de ciment réside dans sa capacité à diminuer la pollution atmosphérique, à l'aide des phénomènes de photocatalyse attribués aux nanoparticules de dioxyde de titane intégrées dans la matrice poreuse du ciment ;

- **produit C** : lait solaire, de marque C1, dans la catégorie « cosmétique ». La voie d'exposition considérée est la voie cutanée. Les propriétés physiques d'absorption et de réflexion des rayonnements ultra-violets par des nanoparticules minérales de dioxyde de titane permettent de substituer significativement l'utilisation de molécules organiques dans la formulation de ce produit ;
- **produit D** : produit amont et non fini, il s'agit d'un ingrédient silice, de marque D1, dans la catégorie « alimentation ». La voie d'exposition considérée est la voie orale. Cette gamme de nano-silice constitue un produit intermédiaire destiné à être incorporé, par un client transformateur, à un sucre de table. La propriété attendue est celle d'antimottant²¹.

On remarquera que le choix des nanomatériaux effectué se montre cohérent avec ceux faisant l'objet d'une attention particulière de la France dans le cadre des travaux actuels de l'OCDE sur les tests de sécurité sanitaire et environnementale pour des échantillons de nanomatériaux manufacturés²².

Afin de compléter les informations disponibles dans la littérature, des auditions ont été organisées avec les industriels concernés. La nature des informations demandées est spécifiée dans le document support (Annexe 2) remis aux industriels sollicités.

Ainsi, le producteur C1 a été auditionné le 21 septembre 2009 et le producteur D1 le 25 septembre 2009.

²¹ Additifs qui, dans une denrée, limitent l'agglomération des particules.

²² La France parraine les essais de sécurité pour le dioxyde de titane (en partenariat avec l'Allemagne) et la silice (en partenariat avec l'union européenne) et contribue à ces tests pour l'argent.

5 Méthodologie d'évaluation des risques

Préalablement à toute réflexion sur la construction d'une méthodologie d'évaluation des risques spécifique, un premier effort a été porté sur l'identification et l'analyse approfondie des outils d'évaluation disponibles applicables au contexte de la saisine. Trois rapports proposant chacun une méthode de caractérisation des risques nano-spécifiques pour l'Homme et l'environnement ont été identifiés par les experts du groupe de travail.

L'objectif visé ici a été de déterminer si l'emploi de l'un de ces trois outils méthodologiques satisfaisait pleinement à l'évaluation des risques dans le cadre de la saisine, s'il était opportun de les adapter ou bien, dans le cas contraire, s'il était nécessaire de développer un nouveau cadre méthodologique.

Les trois documents étudiés sont les suivants :

- *a prudent approach to Nanotech Environmental, Health, and Safety Risks* (Lux Research,2005) ;
- la grille de précaution pour les nanomatériaux synthétiques (FOPH-FOEN,2008) ;
- *Nanorisk framework* (Dupont , Environmental Defense2007).

A prudent approach to Nanotech Environmental, Health, and Safety Risks (Lux Research)

Le cabinet de consultants *Lux Research* a élaboré un outil « clé en main » simple et rapide permettant l'évaluation qualitative du risque nano-spécifique d'un produit fini sur l'ensemble de son cycle de vie. Reprenant le cadre standard des évaluations de risques sanitaires, le niveau de risque d'un produit est défini à partir du niveau de danger intrinsèque du nanomatériau et du niveau d'exposition/dispersion durant le cycle de vie du produit fini.

Dans le détail, le niveau de danger, caractérisé par une échelle à trois degrés (faible, moyen et élevé) se rapporte directement au type de nanomatériau employé. La classification de ce niveau est prédéterminée suivant plusieurs critères déclarés par les auteurs.

De manière identique, la cotation du niveau d'exposition, toujours dans un référentiel à trois échelons (faible, moyen et élevé), est prédéfinie en fonction de la catégorie de produit, pour chacune des étapes du cycle de vie de ce produit (production / utilisation / fin de vie). Un certain nombre de critères est précisé pour estimer ces niveaux d'exposition.

Le niveau de risque nano-spécifique du produit, toujours défini en trois niveaux (faible, moyen et élevé), provient de la combinaison des niveaux de danger et des niveaux d'exposition estimés dans les étapes précédentes. Le résultat, sous forme de tableau croisant le type de nanomatériau avec le type d'application et intégrant un code couleur intuitif, aboutit à une présentation schématique des risques. Cet aspect synthétique rend la présentation particulièrement adaptée à la lecture comparative des risques en fonction des produits.

Cependant, bien que la simplicité d'utilisation soit évidente, les experts regrettent l'absence de la considération du devenir du produit à chaque étape de son cycle de vie. En effet, comme indiqué ci dessus (*cf.* chapitre 3), les nanomatériaux injectés dans la matrice d'un produit peuvent évoluer durant la vie de ce produit. Les nanomatériaux émis (dispersés dans l'environnement et auxquels est exposée la population), et donc leur toxicité, peuvent alors différer des nanomatériaux initiaux.

Par conséquent, une évaluation de la toxicité devrait être idéalement réalisée pour chacune des étapes du cycle de vie. S'ajoute à cela que la toxicité d'un nanomatériau peut dépendre de nombreux facteurs dépendants ou non du type même de nanomatériau (cf. 59 paramètres OCDE, Annexe 8).

D'autres questions méthodologiques se posent, notamment la non-différentiation entre risques pour l'Homme et risques pour l'Environnement, ou encore, comment traiter les produits contenant plusieurs types de nanomatériaux ?

Enfin, plusieurs interrogations subsistent quant aux cotations prédéfinies par les auteurs. D'une part, les critères listés pour ces évaluations sont très généraux et ne semblent pas exhaustifs (leur pertinence et leurs poids ne sont pas expliqués dans le document fourni). D'autre part, les méthodes permettant d'aboutir à ces cotations (danger et exposition) à partir des critères évoqués ne sont pas explicitées. De même, le procédé d'évaluation du risque global en fonction des cotations proposées n'est pas décrit. Ces différents points interdisent l'actualisation des paramètres de cotation avec l'avancée des connaissances scientifiques (ce document a été publié en 2005) et l'extension des catégories employées (nanomatériaux et types d'applications) pour adapter l'outil en tant que tel à notre problématique.

Grille de précaution pour les nanomatériaux synthétiques (FOPH-FOEN)

Cette grille construite par les offices fédéraux suisses de la santé publique (FOPH) et de l'environnement (FOEN) permet d'estimer et de distinguer les risques nano-spécifiques d'un produit contenant des nanomatériaux manufacturés pour les travailleurs (risques professionnels), les consommateurs et l'environnement.

Le principe proposé par la grille consiste à combiner les scores associés à chacun des critères considérés à l'aide d'une formule afin d'aboutir à un score de risque. Les différents risques (employé / travailleur / environnement) sont ensuite caractérisés en fonction des scores obtenus : soit le risque nano-spécifique peut être considéré comme faible et la situation ne requiert pas d'études de risques complémentaires, soit le score de risque nano-spécifique dépasse le seuil d'action et des démarches supplémentaires sont dès lors à engager (études de risques complémentaires, actions de réduction des risques, etc.).

Une des particularités de ce modèle réside dans l'intervention d'un score relatif à l'état des connaissances pour évaluer le niveau de risque encouru. Le calcul de scores à partir de scénarios dit « normaux » mais aussi à partir de scénarios « pire cas » en constitue une autre particularité intéressante.

Cet outil repose sur des bases méthodologiques solides, cela pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la grille s'apparente à un questionnaire à réponses fermées, c'est-à-dire que la réponse apportée à chaque critère d'évaluation n'est pas subjective mais guidée par un jeu de scores dépendant de seuils quantitatifs se référant à des éléments d'information récents (publication en 2008). Ces scores s'intègrent ensuite dans un modèle dont la cohérence (pondération de ces scores, cohérence des unités, etc.) a été vérifiée par un expert extérieur statisticien. Enfin, la grille est accompagnée d'un document explicatif complet pour son utilisation.

Cependant, des limites à cet outil sont aussi constatées, notamment concernant l'estimation des effets potentiels des nanomatériaux. En effet, le score figurant le niveau de ces effets potentiels est calculé uniquement en fonction de deux critères pour l'ensemble du cycle de vie :

- le niveau d'activité redox et/ou catalytique du nanomatériau ;

- la stabilité dans les milieux pertinents (conditions physiologiques et conditions environnementales pour le calcul des effets respectivement pour l'Homme et pour l'environnement).

Ce modèle implique donc la considération d'un niveau de toxicité constant sur l'ensemble du cycle de vie du produit et restreint le mécanisme toxicologique considéré à la seule formation d'espèces réactives oxydantes (ERO). Or, tel qu'indiqué dans le chapitre 3, les paramètres physicochimiques cadrant la caractérisation du nanomatériau, et donc sa toxicité, sont le plus souvent amenés à être fortement modifiés le long du cycle de vie du produit. Les études toxicologiques ont de plus montré que les effets associés à l'exposition aux nanomatériaux ne sont pas exclusivement associés à la formation d'ERO. Ce score, dépendant uniquement de paramètres physico-chimiques conjugués à des données de toxicocinétique (essentiellement la clairance), ne prend pas en compte les études toxicologiques et écotoxicologiques, pourtant très pertinentes (information sur la pénétration de la barrière cutanée pour une exposition cutanée par exemple). Ce modèle ne permet pas non plus de différencier les particularités associées aux différentes voies d'exposition (respiratoire, orale et cutanée).

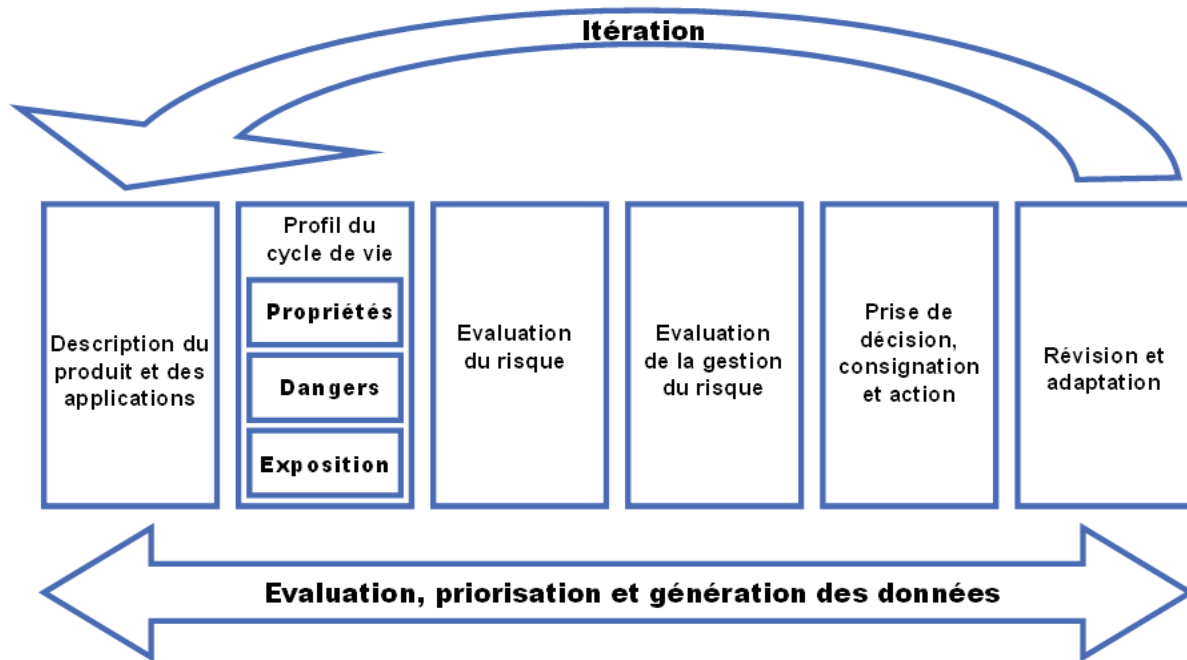
Nanorisk framework (Dupont)

Ce document édité par la société Dupont apporte un référentiel complet pour l'évaluation des risques nano-spécifiques pour l'Homme et l'environnement pour les produits contenant des nanomatériaux manufacturés durant l'intégralité de leur cycle de vie. Destiné aux gestionnaires de risques qui souhaitent fonder leurs décisions sur la base de l'évaluation des risques, cet outil s'inscrit dans une logique itérative d'amélioration continue (cf. Source : Dupont et *Environmental Defense*, 2007

Figure 13) et inclut pour cela des éléments d'aide à la gestion (évaluation de l'efficacité de la gestion des risques, coûts et durées prévisibles, cadre méthodologique des actions à mener en fonction de l'analyse de la situation).

La partie du document affectée à l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux détaille l'ensemble des paramètres à considérer pour chacune des phases de l'évaluation des risques pour une étape du cycle de vie :

- caractérisation des propriétés physico-chimiques ;
- évaluation du danger (pour l'Homme et l'environnement) ;
- évaluation de l'exposition.



Source : Dupont et *Environmental Defense*, 2007

Figure 13 : Schéma explicatif du modèle de gestion des risques *Nano Risk Framework*

Ces données sont classées dans des sous-groupes en 2 catégories : celles appartenant à l'ensemble des données indispensables à renseigner et les données supplémentaires permettant d'affiner l'évaluation. Ce modèle d'évaluation des risques suppose que, à chaque étape du cycle de vie soit associé un jeu de données. Il est par conséquent nécessaire de réunir ces données pour chaque étape du cycle de vie du produit afin d'aboutir à une évaluation correcte des risques pour le cycle de vie entier.

Pour plus de flexibilité du document face aux multiples situations et usages possibles, ce référentiel fournit un canevas de l'évaluation des risques et non un algorithme « prêt à l'emploi ». Le type de données attendues n'est pas précisé, les aspects quantitatifs et la manière de traiter les données sont laissés à l'appréciation de l'utilisateur. Il s'agit donc d'un outil destiné à des spécialistes de l'évaluation des risques appliqués aux nanomatériaux.

Il faut préciser ici que cet outil est utilisé pour des produits contenant une substance dont à peine 10 % (en masse) peut être considérée de taille nanométrique²³.

5.1 Discussion pour la construction d'une échelle de cotation du risque

L'analyse des outils existants présentés dans le paragraphe précédent a permis de nourrir les réflexions sur les modalités de cotation souhaitées pour le traitement des cas concrets lors de l'évaluation des risques.

Les connaissances lacunaires actuelles pour les produits finis et les nanomatériaux intégrés ne permettent pas pour le moment d'aboutir à une évaluation quantitative des risques nano-spécifiques. Cependant, le groupe de travail s'est attaché à construire un outil d'évaluation permettant de hiérarchiser les risques nano-spécifiques, en suivant une échelle de cotation

²³ http://www.edf.org/documents/6552_TiO2_Summary.pdf

simplifiée (petit nombre de niveaux). Cette classification peut s'effectuer sur la base d'un score de risque calculé de manière explicite à partir d'un nombre de paramètres suffisant caractérisant distinctement le niveau de danger et le niveau d'exposition associés à chacune des étapes étudiées du cycle de vie du produit.

Ainsi, l'idéal serait de concevoir un outil capable de considérer l'ensemble des paramètres listés par le document Nano Risk Framework dans un cadre méthodologique apparenté à celui proposé par la grille de cotation des offices fédéraux suisses (questionnaire dont les réponses sont associées à un score) et dont le résultat final, présenté sous forme synthétique et intuitive proche de celle du document Lux Research, se rapporte à l'intégralité de la partie du cycle de vie étudié.

Les documents étudiés ne correspondant pas individuellement à ces attentes, le groupe d'experts a décidé d'examiner la faisabilité d'une méthodologie conciliant les avantages identifiés de chacun d'entre eux.

	Avantages	Inconvénients
<p><u>Lux Research (2005)</u> <i>A prudent approach to Nanotech Environmental, Health, and Safety Risks</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Vision synthétique, communication 	<ul style="list-style-type: none"> • Actualisation des paramètres • Echelle de cotation • Pas d'évaluation de la toxicité, ni du risque, à chaque étape du cycle de vie
<p><u>FOPH-FOEN (2008)</u> Grille de précaution pour les nanomatériaux synthétiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode de cotation du risque • Eléments d'information plus récents 	<ul style="list-style-type: none"> • Nombre de critères insuffisant • Pas de prise en compte de la toxicité et de l'écotoxicité à chaque étape du cycle de vie
<p><u>Dupont (2007)</u> <i>NanoRisk Framework</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Paramètres pertinents en nombre et en qualité pour une évaluation du risque au cours du cycle de vie • Prise en compte des coûts et du temps pour l'évaluation 	<ul style="list-style-type: none"> • Communication, restitution • Plus destiné aux experts

Tableau 2 : Récapitulatif synthétique des avantages et inconvénients des outils méthodologiques analysés.

Dans cette visée, deux travaux complémentaires ont été simultanément accomplis. Le premier a consisté à établir la liste des paramètres indispensables à prendre en compte dans le modèle de cotation, le second à concevoir les bases d'un algorithme permettant de calculer correctement le score de risque à partir des réponses apportées pour chacun des paramètres du modèle.

Référentiel des paramètres à considérer

Plus qu'une simple énumération des paramètres indispensables à l'évaluation des risques, le but de ce référentiel revient aussi à définir la nature des réponses attendues, notamment en mettant ces paramètres en correspondance avec les tests standardisés de l'OCDE (lignes directrices) permettant de les obtenir, ceci afin de pouvoir alimenter correctement la grille de cotation.

L'Afsset participe aux groupes internationaux chargés de définir les fondements de l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux spécifiques aux nanomatériaux. Parmi ceux-ci, un groupe de travail « sécurité des nanomatériaux manufacturés » a été mis en place en 2006 dans le cadre de l'OCDE. La construction d'une base de données comportant 59 tests incluant la caractérisation, la toxicité, l'écotoxicité de 14 nanomatériaux manufacturés constitue l'un des travaux à la charge de ce groupe. A ce titre, un document de travail définissant les paramètres concernés a été publié récemment²⁴, l'adaptation des tests habituellement pratiqués sur des substances chimiques aux nanomatériaux étant encore discutée (voir Annexe 8).

Ainsi, l'ensemble des paramètres, issus du croisement des données de ce document de travail de l'OCDE avec celles listées dans le document Nano Risk Framework et complétées par les experts du groupe de travail Afsset, sont répartis en plusieurs items :

- caractérisation du nanomatériau ;
- identification du danger pour l'Homme ;
- identification du danger pour l'environnement ;
- évaluation de l'exposition humaine et de la dispersion environnementale.

Grille de cotation des risques

Sur le modèle de la grille suisse, le groupe de travail a orienté ses efforts vers la conception d'une grille de cotation permettant de calculer un score de risques nano-spécifiques pour des produits de consommation. Ce score de risque est objectivé sur la base d'un algorithme intégrant les paramètres identifiés dans le référentiel présenté ci-dessus. La sélection initiale d'un modèle reposant sur une grille à réponses fermées, c'est-à-dire proposant pour chaque question un choix parmi des réponses préétablies associé à un score de risque, s'explique essentiellement par la nécessité de cadrer objectivement les réponses apportées, et donc de limiter l'aspect subjectif de l'évaluation.

La conception de cet outil requiert par conséquent l'établissement de seuils quantitatifs ou qualitatifs pertinents pour ces paramètres qu'il convient ensuite d'associer à des scores représentatifs du niveau de risque, ainsi que l'élaboration d'un algorithme permettant de combiner et pondérer l'ensemble de ces données pour calculer un score de risque global du scénario.

Cette contrainte méthodologique d'examen des paramètres ciblés a permis d'engager une réflexion particulièrement enrichissante sur l'état actuel des connaissances des corrélations entre les paramètres et les effets et leur portée dans le cadre de l'évaluation des risques nano-spécifiques.

Malgré l'état avancé des discussions nécessaires à sa conception, cet outil n'a pas été finalisé en raison notamment de l'ampleur du travail à réaliser dans un temps imparti très court. Rappelons que la vérification de la cohérence de l'algorithme de la grille de cotation suisse, malgré le faible nombre de paramètres considérés, a sollicité les compétences d'un expert statisticien externe en appui au groupe d'experts en charge de sa réalisation. De plus, au-delà de ces contraintes de type organisationnelles, la réussite d'une telle démarche n'est actuellement pas garantie. En effet, de nombreuses interrogations persistent sur plusieurs plans de l'évaluation des risques et pèsent sur la faisabilité d'un tel outil. Au cours des travaux de réflexion engagés par le groupe d'experts, la difficulté de réaliser un outil adapté au large ensemble des situations rencontrées dans le contexte de l'étude a été soulevée : l'influence des paramètres pris en compte sur le niveau de risque (donc leur pondération des scores dans le calcul) n'est pas forcément identique selon le scénario étudié. Il est donc aujourd'hui parfaitement légitime de s'interroger sur la faisabilité, et la pertinence, de réaliser un algorithme unique destiné à un champ d'utilisation aussi vaste que celui généré par l'utilisation des produits de consommation contenant des nanomatériaux manufacturés.

²⁴ [http://appli1.oecd.org/olis/2008doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2008\)13-rev](http://appli1.oecd.org/olis/2008doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2008)13-rev)

Enfin, les prochains résultats issus des travaux de l'OCDE sur plus de 14 nanomatériaux apporteront certainement des éléments d'information cruciaux à ces réflexions. Il apparaîtrait au final judicieux de reprendre ces travaux à la lumière de données futures pour concevoir à terme un outil abouti.

5.2 Méthode employée pour l'évaluation qualitative des risques

Fort des réflexions engagées sur la conception d'une grille de cotation, le groupe de travail s'est dirigé vers une méthodologie plus classique d'évaluation des risques consistant à examiner au cas par cas les risques nano-spécifiques engendrés lors de l'utilisation des produits sélectionnés (cf. chapitre. 4).

Dans ce contexte, l'ébauche d'une grille de cotation a servi de trame commune aux scénarios pour l'évaluation des risques nano-spécifiques. Ce document liste les étapes clés nécessaires à examiner, ainsi que l'inventaire des paramètres essentiels à considérer pour la bonne réalisation des différentes phases de l'évaluation des risques :

- l'évaluation de l'exposition humaine et la dispersion dans l'environnement ;
- l'évaluation du danger pour l'homme ;
- l'évaluation du danger pour l'environnement.

5.2.1 Méthode d'élaboration des scénarios d'exposition

Les scénarios associés à chacun des produits sont principalement réalisés à partir des données bibliographiques suivantes, par ordre décroissant d'intérêt :

- des lignes directrices existantes pour le type de produit ;
- des recommandations d'utilisation pour un usage normal du producteur et/ou du distributeur ;
- des pratiques constatées pour un usage normal pour le type de produit ;
- des usages constatés pour des produits de types proches ;
- des données de caractérisation fournies par les industriels lors d'auditions.

Lorsqu'aucune donnée n'est disponible, un scénario appelé « pire-cas » est défini à partir d'hypothèses conduisant à une maximisation de l'exposition, en restant dans le cadre d'utilisation du produit pour lequel il est destiné.

Le contexte de l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux est caractérisé par un niveau particulièrement élevé des incertitudes. Afin de réduire le niveau d'incertitude associé aux résultats de cette expertise, il a été décidé de restreindre le champ des évaluations des risques à la seule exposition majoritaire consécutive à l'utilisation du produit concerné et de ne traiter que la voie d'entrée la plus exposée. Ainsi, l'exposition indirecte²⁵ humaine aux nanomatériaux manufacturés dispersés dans l'environnement consécutive à l'utilisation des produits ne sera pas traitée dans le cadre de l'évaluation des risques pour l'Homme. Seule l'identification des milieux récepteurs contaminés sera abordée.

²⁵ L'exposition directe est définie comme découlant du contact direct avec, ou à proximité immédiate, avec le produit à chaque étape de son cycle de vie, sciemment ou non. L'exposition humaine directe se distingue de l'exposition humaine indirecte en ce qu'aucune voie importante dans l'environnement n'intervient entre le point d'émission et le point d'exposition humaine.

5.2.2 Méthode d'identification des dangers et évaluation des risques

Dans la pratique, les publications toxicologiques et écotoxicologiques ou encore épidémiologiques de qualité relatives à des nanomatériaux dont les caractéristiques, lorsqu'elles sont connues, sont identiques ou proches de celles présentées par les nanomatériaux manufacturés introduits dans les produits étudiés, s'avèrent souvent peu nombreuses. Ainsi, la méthode de sélection des publications choisie par le groupe d'experts a consisté à ne pas restreindre le champ bibliographique aux seules études toxicologiques et écotoxicologiques réputées de qualité²⁶ portant sur des nanomatériaux dont les propriétés physico-chimiques (lorsqu'elles sont connues) sont identiques ou proches de celles des nanoparticules intégrées dans le produit fini. Au contraire la discussion collective a été fondée sur la base d'une revue bibliographique la plus exhaustive possible en tenant compte de la voie d'exposition principale. Pour cela, un tableau de synthèse de la revue bibliographique par nanomatériau entrant a été réalisé afin de prioriser les données issues de la littérature, en fonction de plusieurs critères, parmi lesquels la qualité des travaux décrits et le degré de cohérence entre le nanomatériau dans cette publication et le nanomatériau retenu pour le scénario.

5.2.3 Méthode d'évaluation des risques :

Les risques, pour l'homme et l'environnement, sont caractérisés à partir de l'analyse effectuée par le groupe de travail, en croisant les résultats de l'évaluation de l'exposition avec ceux des dangers pour l'Homme puis en croisant les résultats de l'évaluation de la dispersion environnementale avec ceux des dangers pour l'environnement.

²⁶ C'est-à-dire par exemple satisfaisant aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL).

6 Evaluation des risques pour les produits sélectionnés

6.1 Introduction

Les évaluations de risques respectives pour les quatre produits précédemment sélectionnés (*cf.* chapitre 4.3) sont successivement déroulées de manière indépendante en suivant la méthodologie présentée au chapitre 5.2. Une courte présentation du type de produit et du nanomatériau concerné (propriétés attendues, utilisations constatées, *etc.*) précède chacun de ces travaux d'évaluation. Par souci de clarté, chacune de ces études est subdivisée en trois parties distinctes :

- évaluation de l'exposition et de la dispersion ;
- identification des dangers (homme et environnement) ;
- évaluation du risque.

Enfin, un bilan général réalisé sur la base des quatre cas examinés est présenté à la fin de ce chapitre.

Malgré le manque de connaissances évident à l'heure actuelle en matière de toxicologie et d'écotoxicologie des nanoparticules, il est communément admis que ces objets se distinguent des substances particulaires habituelles (non nanométriques) en ce qui concerne leurs interactions avec le vivant. Ainsi, préalablement aux évaluations de risques entreprises dans ce rapport, très spécifiques aux produits ciblés, sont rappelées des généralités en termes d'effets biologiques potentiels des nanoparticules (considérées comme essentielles à la compréhension des problématiques d'identification des dangers en toxicologie et écotoxicologie).

6.2 Effets biologiques potentiels des nanoparticules

6.2.1 Toxicologie

Comme toute substance chimique, le devenir des nanoparticules dans l'organisme humain et la toxicité potentielle associée vont dépendre notamment de leurs propriétés physico-chimiques (taille, forme, caractère soluble, *etc.*). Les phénomènes d'absorption, de distribution, le métabolisme et l'excrétion semblent être différents par rapport à une entité chimique classique, de part leurs caractéristiques spécifiques. Il est aujourd'hui évident que la prise en compte d'un nombre restreint de caractéristiques n'est pas suffisante pour interpréter leurs effets potentiels. De façon générale, la transposition des connaissances « micro » à l'échelle nano reste un champ d'études à part entière.

Ainsi, la connaissance des voies de pénétration dans l'organisme apparaît comme étant un pré-requis indispensable à l'évaluation toxicologique. Les études de toxicocinétique des nanoparticules sont essentielles pour la caractérisation des dangers.

Elles permettent en outre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dispersion des nanomatériaux dans l'organisme ainsi que de déterminer les organes cibles en fonction de la (ou des) voie(s) d'entrée possible(s), les phénomènes de translocation (vers des organes secondaires) et de bio persistance.

Certaines voies d'absorption et de translocation ont déjà été démontrées, mais d'autres restent hypothétiques et doivent être étudiées (Oberdorster, 2005). Les taux de transfert sont encore en grande partie inconnus, ainsi que l'accumulation et la rétention dans des organes et tissus cible. Les voies d'absorption des nanoparticules, attendues et connues, en fonction de l'exposition ainsi

que les voies de distribution et d'élimination peuvent être schématisées telles que le montre la Figure 14 ci-dessous :

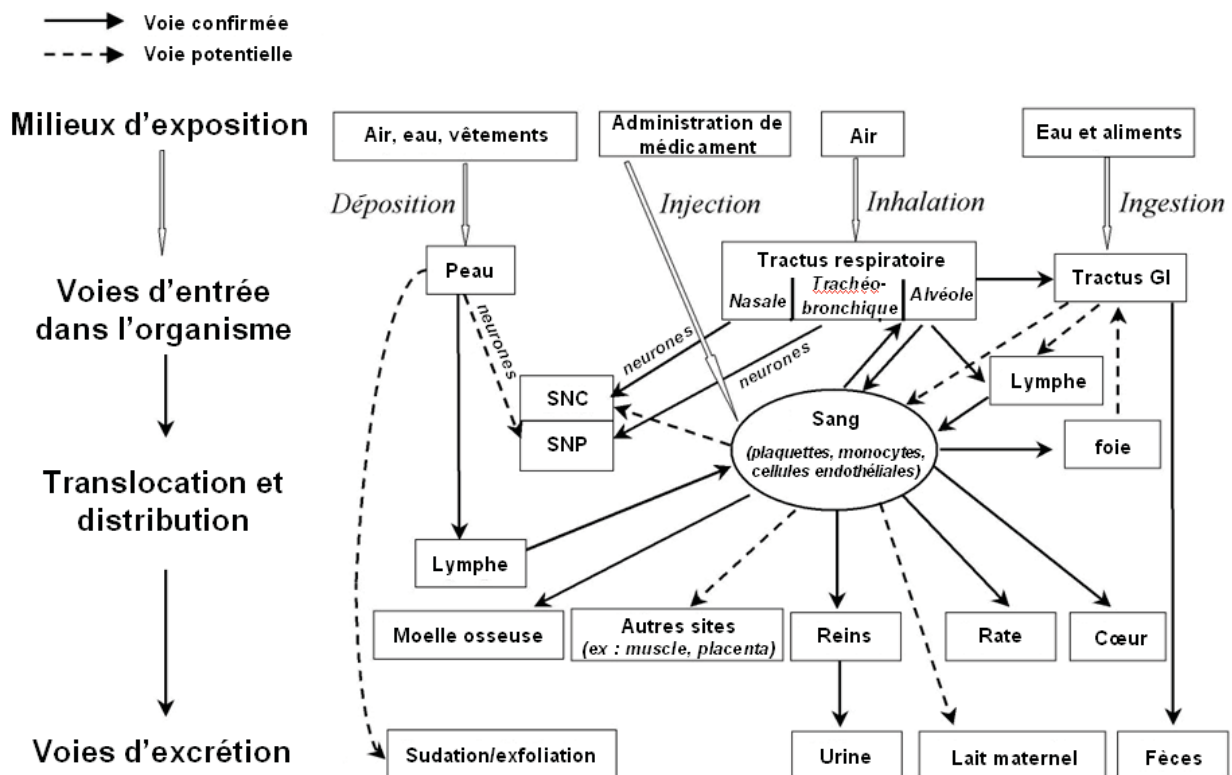


Figure 14 : Bio cinétiques de particules de taille nanométrique (d'après Oberdorster G., 2005).

Ces études de toxico cinétique devraient permettre également de mieux comprendre les mécanismes de déposition et de clairance, les effets pulmonaires, les phénomènes de translocation vers des organes secondaires etc.

Comme le précise le rapport de l'IRSST (IRSST,2008) sur les nanoparticules : « Elles peuvent donc se retrouver dans le sang en ayant franchi les membranes pulmonaires ou gastro-intestinales, se distribuer dans les différents organes et s'accumuler dans certains sites spécifiques. ».

Parmi les mécanismes de toxicité des nanoparticules, on retrouve des phénomènes impliquant la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et à l'interruption de la synthèse d'ATP. Ces effets peuvent entraîner à leur tour des lésions de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire, pouvant conduire potentiellement à une cancérogénicité. La production d'espèces réactives de l'oxygène a été clairement identifiée comme un mécanisme d'action toxique des nanoparticules sur des cellules eucaryotes, mais d'autres mécanismes peuvent également être impliqués. Les principaux mécanismes cytotoxiques et génotoxiques identifiés ou probables des nanoparticules sont résumés dans la Figure 15 ci-dessous :

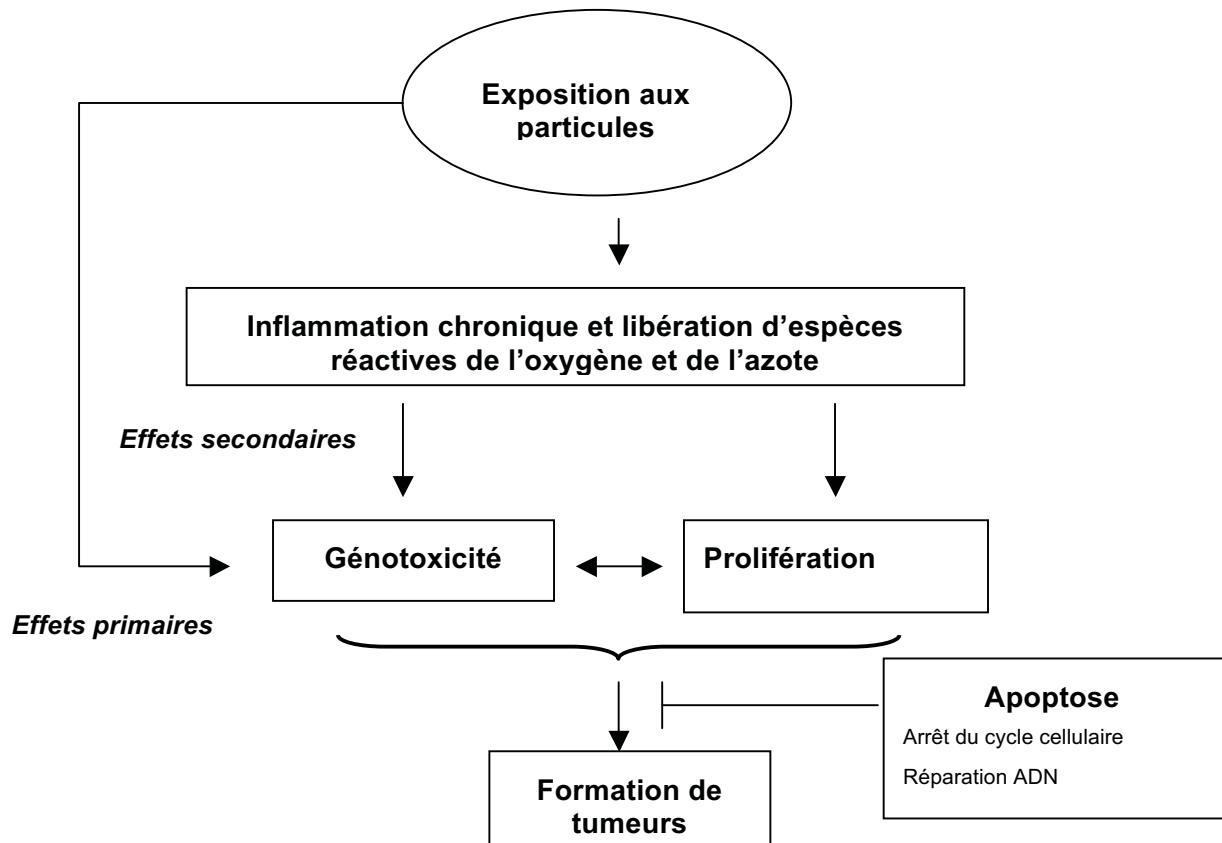


Figure 15 : Voies de génotoxicité primaires et secondaires impliquées dans la cancérogénicité des particules (D'après (Schins R.P.F., Knaapen A.M.,2007).

Ainsi, des effets génotoxiques primaires directs et indirects mais également des effets génotoxiques secondaires peuvent survenir :

1. Effets primaires directs

les nanoparticules pénètrent dans le noyau et interagissent directement avec l'ADN ;

Les nanoparticules produisent des radicaux libres induisant des lésions de l'ADN ou perturbent la ségrégation des chromosomes pendant la mitose. En effet, du fait de leur gamme de taille nanométrique, il est communément admis que les nanoparticules sont capables d'interagir et éventuellement d'interférer avec des constituants cellulaires de dimension comparable tels que les nucléosomes, les microtubules, les filaments d'actine et les centrosomes. Ainsi, l'interférence avec ces structures peut mener à un dysfonctionnement de la division cellulaire et perturber le trafic cellulaire (Gonzalez L., 2008). Chen *et al.* ont montré que l'incorporation de nanoparticules de silice dans le noyau cellulaire a induit la formation d'agrégats de protéines intranucléaires qui a entraîné l'inhibition de la réplication, de la transcription, et de la prolifération cellulaire (Chen M., von Mikecz A.,2005).

2. Effets primaires indirects

Les particules entraînent :

- une déplétion en antioxydants, ce qui augmente le niveau de lésions oxydatives de l'ADN endogènes et rompt l'état d'équilibre et/ou ;
- une augmentation des lésions oxydatives de l'ADN *via* l'activité mitochondriale et/ou ;

- une inhibition de la réparation de l'ADN, etc.

Très récemment, un autre mécanisme d'action génotoxique impliquant des cascades de réactions a été identifié *in vitro*. Des nanoparticules de CoCr ont été mises en contact avec une barrière de cellules confluentes (cellules BEWO) et de fibroblastes humains en dessous, les fibroblastes étant les cellules cibles. Les nanoparticules induisent des lésions mitochondriales dans la couche supérieure de la barrière BEWO, les ions Co^{2+} mimant les conditions hypoxiques. Ces deux conditions entraînent une libération d'ATP qui peut passer soit *via* des canaux (récepteurs P2X à activité intrinsèque de canal ionique, canaux à pannexine) ou jonctions, (jonctions communicantes à connexine) pour aller agir sur des récepteurs P2Y (couplé à des protéines G) des cellules de la deuxième couche, soit passer directement à travers les jonctions communicantes à connexine dans la deuxième couche de cellules. Dans la deuxième couche de la barrière, l'ATP (directement ou *via* l'activation des récepteurs P2Y) entraîne une augmentation du calcium intracellulaire et une sécrétion subséquente d'ATP. Cet ATP provoque alors des lésions de l'ADN des fibroblastes humains *via* leurs récepteurs P2 (Bhabra G., 2009).

3. Effets secondaires

Ces effets sont liés à l'inflammation, *via* des composés oxydants provenant notamment de l'endocytose et/ou de la phagocytose des nanoparticules. En effet, les nanoparticules peuvent entraîner du stress oxydant et des réponses inflammatoires qui peuvent également induire potentiellement des lésions de l'ADN (Singh N., 2009). Ces mécanismes indirects sont résumés dans la figure ci-dessous :

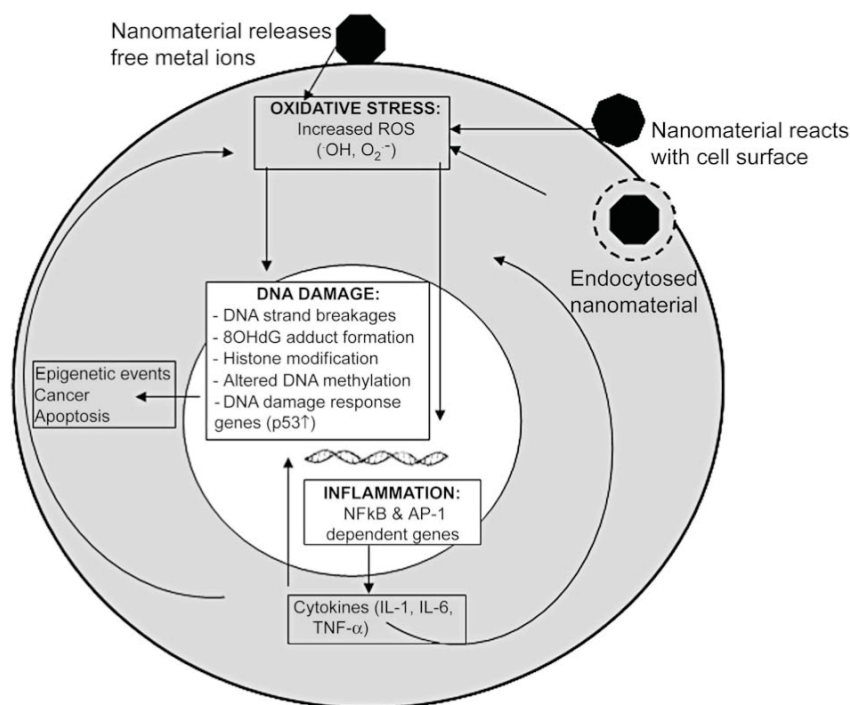


Figure 16 : Mécanismes indirects qui peuvent conduire à la génotoxicité (d'après Singh N., 2009).

En plus de la toxicocinétique et des effets génotoxiques, l'évaluation toxicologique des nanoparticules devra porter une attention toute particulière aux organes cibles (le foie, les reins, le système nerveux central (SNC), les organes du tractus gastro-intestinal les poumons, la rate), mais devra également s'intéresser à leur potentiel reprotoxique et immunotoxique. De façon plus générale, le corpus de connaissances à acquérir pour l'évaluation est encore considérable.

Des modèles inappropriés peuvent générer des résultats non pertinents, non extrapolables au vivant. En revanche, un modèle cellulaire bien choisi (co-cultures, cellules primaires fonctionnelles *etc.*) avec des conditions expérimentales définies et maîtrisées, permettrait de mettre en évidence des mécanismes d'action toxique spécifiques. Si l'apparition de lésions oxydantes de l'ADN, de facteurs d'inflammation, *etc.* était reliée aux effets observés, il conviendrait de déterminer s'ils sont exclusifs ou non.

6.2.2 Écotoxicologie

Les nanoparticules manufacturées sont susceptibles de se retrouver dans tous les compartiments physiques (air, eau, sols et à terme sédiments) et/ou biologiques de l'environnement.

Les voies d'exposition des organismes aux nanoparticules diffèrent selon les espèces considérées. Les procaryotes comme les bactéries pourraient se voir protégés contre l'entrée de nanoparticules à l'intérieur de la cellule, puisque leur paroi cellulaire ne possède pas les mécanismes de transport de particules colloïdales. Cependant, l'adsorption des nanoparticules à la surface de la paroi de ces organismes n'exclut pas des effets toxiques de ces particules. En revanche, chez les eucaryotes, la situation est différente puisqu'ils sont dotés de mécanismes d'internalisation (endocytose, phagocytose) de nano et micro particules (Moore M.N., 2006). Les organismes aquatiques peuvent être exposés aux nanoparticules par ingestion directe ou par leur entrée à travers les cellules épithéliales (ex. : la peau ou les branchies pour les poissons). Les organismes du sol, comme les vers, sont également exposés aux nanoparticules par contact direct et/ou ingestion de particules du sol.

La destinée environnementale et l'écotoxicité des nanoparticules est influencée par un grand nombre de facteurs comme la taille des particules et leur distribution, la solubilité, l'état d'agrégation, la nature chimique ou minéralogique, la cristallinité, la surface spécifique, la charge de surface, la concentration (masse et nombre), la structure ou encore la présence d'impuretés (Tiede K., 2009). Ainsi, certains travaux ont testé l'influence de ces facteurs sur l'écotoxicité des nanoparticules. Depuis ces cinq dernières années, l'écotoxicologie des nanoparticules a reçu une attention croissante mais ces travaux ont été conduits presque exclusivement avec des nanoparticules synthétisées en laboratoire. De plus, les études concernant des expositions à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental sont rares. L'une des raisons majeures pour expliquer ce manque de données est la forte demande de tests sur des cellules, la difficulté de détection et de quantification des nanoparticules manufacturées dans des matrices complexes comme les milieux aquatiques (eaux douces, marines, estuariennes), les sédiments et les sols. Dans ces environnements, une multitude de substances complexantes sont présentes, qui, non seulement rendent la détection et la quantification difficiles, mais affectent également la mobilité et les propriétés de surface des nanoparticules, qui par voie de conséquence conditionnent leur transport et leur toxicité vis-à-vis des organismes. Il est donc indispensable dans les études de toxicité de caractériser précisément l'exposition. Des revues récentes de la littérature discutent des techniques, actuellement disponibles, de détection et quantification des nanoparticules dans l'environnement (Burleson D.J., 2004; Lead J.R., Wilkinson K.J., 2006; Oughton D.H., 2008).

Les effets directs de la toxicité des nanoparticules sur les organismes sont principalement dus à leur composition chimique et à leur réactivité de surface. Cette réactivité de surface est due à l'importance des atomes de la surface par rapport aux atomes du « cœur » et à des propriétés « nano » particulières (Auffan M.A., 2009). Les effets associés à la taille nanométrique sont les suivants : augmentation du produit de solubilité par rapport au même matériau à l'échelle supra nanométrique, libération d'ions toxiques (par exemple des métaux) ou encore production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) associées à des transferts d'électrons (paire électron-trou) extrêmement rapides. De plus, les nanoparticules peuvent également servir de vecteurs d'autres polluants, augmentant ou diminuant la biodisponibilité d'autres substances toxiques ou encore interagir avec des protéines telles que des enzymes.

Les travaux de la littérature rapportent des effets écotoxicologiques variés des nanoparticules chez différentes espèces bactériennes, végétales, animales, terrestres et/ou aquatiques. Par l'intermédiaire d'expositions d'organismes à des nanoparticules en laboratoire, de tests (par

exemple des bioessais OCDE) d'écotoxicité aiguë, chronique et/ou sub-chronique, différents effets critiques ont été mesurés : mortalité, inhibition de la croissance, impact sur le développement et la respiration, stress oxydant (augmentation des concentrations des biomarqueurs de stress oxydants : catalase, Super Oxyde Dismutase, GST), *etc.*

Des effets positifs de l'exposition des organismes à des nanoparticules ont également été rapportés dans la littérature. Par exemple, le dioxyde de titane (TiO₂) sous sa forme nanométrique induit la germination et la croissance de certaines plantes (Zheng L., 2005). Ces effets positifs pourraient être dus aux propriétés antimicrobiennes qui augmenteraient la résistance des plantes au stress. Certaines nanoparticules pourraient également être susceptibles de séquestrer les nutriments à leur surface et servir ainsi de « réservoir à nourriture » pour les organismes. Les algues vivant dans des environnements extrêmes présentent la capacité d'accumuler à la surface de leur paroi des éléments minéraux indispensables à leur survie dans des milieux de faible disponibilité alimentaire (Luetz-Meindl U., Luetz C., 2006). Ainsi, les nanoparticules contenant des éléments essentiels comme le cuivre ou le zinc semblent particulièrement appropriées pour suppléer un manque de nutriments.

6.3 Textile et argent

L'argent est utilisé pour la purification de l'eau, le traitement des plaies, dans les prothèses osseuses, la chirurgie orthopédique de reconstruction, des dispositifs cardiaques, des cathéters et des appareils médicaux. Les progrès de la biotechnologie ont notamment permis l'incorporation de l'argent ionisable dans des textiles à usage clinique afin de réduire le risque d'infections nosocomiales ou pour l'hygiène personnelle.

L'action antimicrobienne de l'argent ou des composés à base d'argent apparaît proportionnelle aux ions argent monovalent bioactifs (Ag⁺) libérés et à leur disponibilité pour interagir avec les membranes des cellules bactériennes ou fongiques. L'argent métal et les composés inorganiques à base d'argent peuvent s'ioniser en présence d'eau, de liquides corporels ou d'exsudats tissulaires. Les ions argent sont alors biologiquement actifs et interagissent facilement avec les protéines, les résidus d'acides aminés, les anions libres et des récepteurs membranaires des cellules de mammifères et eucaryotes. La sensibilité des bactéries (et probablement des champignons) à l'argent est corrélée à leur capacité d'absorption intracellulaire d'argent, qui est susceptible d'interagir et de dénaturer de façon irréversible les principaux systèmes enzymatiques.

L'intégration de nanoparticules d'argent au sein de nombreux produits répond essentiellement à une attente de propriétés biocides. Ces nanoparticules sont employées pour des produits destinés à des applications très diverses (électroménager²⁷, ustensiles de cuisine²⁸, informatique²⁹, textiles *etc.*), pour leur propension à combattre le développement des moisissures (anti-fongique) et des bactéries (anti-bactérien), en vue d'une fonction anti-odeur ou anticontamination.

Les concentrations mises en jeu en fonction des différents usages peuvent varier en fonction des producteurs et intégrateurs, cependant, les ordres de grandeur concernés communément admis sont les suivants (d'après NanoForum Avril 2009 – Conférence E.Gaffet) :

- désinfection de surfaces : 1 – 10 ppm ;
- hygiène corporelle (désodorisants, savons liquides) : 5 – 8 ppm ;
- hygiène corporelle (savon solide) : 20 – 50 ppm ;
- plastiques éponges et peinture : 20 – 200 ppm ;

²⁷ Filtre d'aspirateurs, filtres de réfrigérateurs, machines à laver, sèche-cheveux, ...

²⁸ Planches à découper,

²⁹ Téléphones mobiles, claviers d'ordinateurs,

- récipients clos : 20 – 50 ppm ;
- serviettes imprégnées, toile de matelas, T-shirt: 5 – 10 ppm ;
- chaussettes et chaussures : 20 – 40 ppm ;
- murs et plafonds : 10 – 20 ppm ;
- tapis et revêtement de sol : 20 – 50 ppm ;
- produits d'entretien de sol : 1 – 5 ppm.

Pour le secteur particulier des textiles nano-argent destinés à la consommation courante, la fonction anti-odeur sans traitement chimique constitue l'application la plus revendiquée dans les mentions commerciales. Quelques applications très spécifiques disposant d'une fonction anti-contamination du tissu (*i.e.* : tissus destinés aux grands brûlés) peuvent être identifiées, mais elles demeurent assez marginales. La vue obtenue par microscope électronique à balayage (MEB) présentée Figure 17 illustre l'incorporation de nanoparticules d'argent à des fibres de coton.

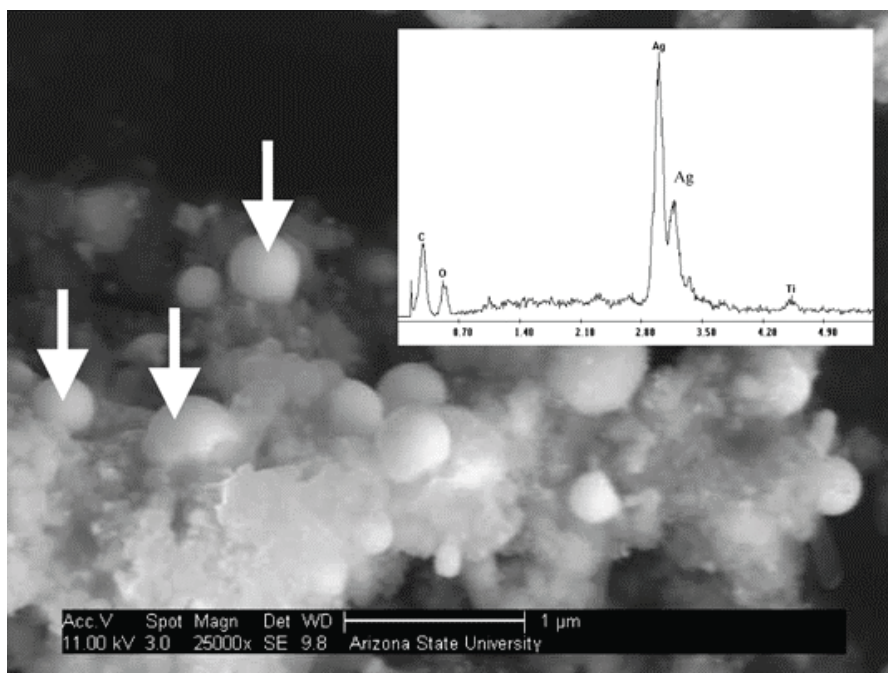


Figure 17 : Vue par MEB de nanoparticules d'argent intégrées à des chaussettes (Benn T.M., Westerhoff P.,2008).

6.3.1 Evaluation de l'exposition

6.3.1.1 Caractérisation du produit sélectionné

Le produit commercial sélectionné pour l'étude de cas est le produit désigné « A ». Il correspond à une paire de chaussettes commercialisée par un producteur européen de textiles spécialisé dans les tissus incorporant du nano-argent. Les informations données ci-dessous concernant le produit A ont été acquises par le groupe de travail par l'intermédiaire du site internet du producteur. Le groupe de travail ne dispose donc pas de données quant à la caractérisation du nano-argent présent dans le produit A. Les propriétés annoncées du produit (anti-bactérien, antifongique et anti levure) correspondent aux propriétés attendues des nanoparticules d'argent.

Ce produit est constitué, d'après le producteur, de 20 % d'élasthane et de 80 % de coton, comportant 0,3 % (pourcentage massique) de « nano-argent », intégré à la fibre de coton. Toujours d'après le producteur, les diamètres des particules de nano-argent seraient compris entre

25 et 250 nm. Les résultats d'analyse de l'argent intégré au produit, obtenus à l'aide de 2 méthodes standards de l'ASTM³⁰ (D1348 et D3516), mentionnés sur le site internet de vente de l'article, indiquent une pureté du nano-argent de l'ordre de 99,9 % ainsi que l'existence de concentrations résiduelles en métaux lourds³¹.

Tableau 3 : Analyse des masses et concentrations massiques en nano-argent dans différents échantillons de produits (d'après T.M Benn. et P.Westerhoff, 2008)

Echantillon	Masse d'argent par masse de produit	Masse moyenne de la chaussette	Masse totale de l'argent dans l'échantillon	Masse cumulée d'argent émis après 4 lavages de 24 h
	(µg / g)	(g)	(µg)	(µg)
1a	25,8	29,3	756	836
1b	57,8	27,3	1 578	1 845
2	2,1	28,6	60	NR*
3	1 358,3	23,0	31 241	165
4	35,9	58,6	2 104	NR*
5	NR*	24,2	NR*	NR*
6	0,9	21,9	20	19

* en dessous du seuil de détection

Les travaux réalisés par Benn *et al.* (Benn T.M. et Westerhoff P., 2008) sur 6 paires de chaussettes comportant la mention commerciale nano-argent rapportent des masses de nano-argent contenues dans ces articles comprises entre 20 et environ 30 000 µg. Les concentrations massiques sont donc comprises entre 1 et 1 400 µg/g de chaussette (*cf.* Tableau 3). Une étude plus récente (Geranio L., 2009) portant plus largement sur des textiles incorporant des nanoparticules d'argent (dont des chaussettes anti-odeurs), a mis en parallèle la teneur d'argent intégré au produit avec la technologie d'incorporation de cette substance, sous forme nanoparticulaire ou non, au sein du textile. La teneur maximale en argent a été constatée pour des chaussettes commercialisées (21,6 mg/g), produit pour lequel l'argent n'est en réalité pas sous forme nanoparticulaire (couches d'argent de plusieurs micromètres d'épaisseur sur la fibre obtenue par déposition électrochimique). Pour des chaussettes, la concentration maximale observée pour l'argent apparemment sous forme nanoparticulaire (nanoparticules intégrées au coton) est de 2,66 mg/g. L'examen des 7 autres textiles modifiés étudiés a révélé des concentrations sensiblement inférieures (de 3 à 390 µg/g).

La proportion massique calculée à partir des déclarations du producteur du produit sélectionné, dans le cadre de ce scénario, (0,3 % massique de nanoparticules d'argent intégré aux fibres de coton composant 80 % du produit) est la suivante :

$$80 \% \times 0,3 \% = 0,24 \% \text{ soit une concentration massique de } \mathbf{2,4 \text{ mg/g.}}$$

³⁰ American Society for Testing Materials

³¹ Arsenic (< 0,06 ppm), cadmium (< 0,05 ppm), mercure (< 0,05 ppm) et plomb (0,3 ppm)

Cette concentration se situe donc au-delà de la limite supérieure des teneurs nominales observées dans les travaux de Benn *et al.*, mais se montre tout à fait cohérente avec la concentration maximale en argent nanoparticulaire constatée pour un produit commercial équivalent. Ce produit s'avère donc tout à fait adapté à un scénario maximisant l'exposition, tout en restant dans le cadre de l'usage pour lequel il est destiné.

6.3.1.2 Définition du scénario d'exposition pour l'homme

Le groupe de travail ne disposant ni de la caractérisation du nano-argent dans le produit A, ni de données sur le relargage ou la consommation de ce produit, le scénario proposé ici est basé sur un ensemble d'hypothèses.

La co-exposition avec d'autres substances éventuellement présentes dans le produit A (dont des traces d'éléments métalliques) ou avec d'autres produits qui seraient appliqués au niveau cutané par le consommateur n'est pas considéré dans le scénario.

La seconde hypothèse posée est que le consommateur ne sera en contact qu'avec des nanoparticules d'argent. En l'absence de données complémentaires, l'ajout d'une substance organique lors du procédé d'intégration (qui permet de modifier les caractéristiques des nanoparticules d'argent, d'empêcher l'agrégation et la croissance ultérieure des particules au moment de la précipitation) n'est pas considéré.

Nous ne disposons pas de données quantitatives quant au relargage des particules d'argent sous forme de nanoparticules ou d'ions argent lors du lavage du produit A considéré. Cependant, nous disposons de données sur le relargage d'autres produits équivalents. La dégradation du produit, à travers la diminution de la concentration de nano-argent, lors de son usage (manipulation et lavage), fait aujourd'hui l'objet de nombreux travaux (Benn T.M. et Westerhoff P., 2008; Blaser S.A., 2008, Geranio L., 2009). Ces résultats publiés rendent notamment compte de la large diversité des comportements des tissus modifiés, et donc de l'ampleur de l'incertitude introduite par ce paramètre clé. Cependant, dans le double objectif de maximiser l'exposition et de prendre en compte le renouvellement de l'article par le consommateur, nous considérerons, pour l'exposition humaine, que la concentration en nano-argent dans la chaussette considérée reste inchangée et correspond donc à la concentration initiale.

De plus, nous ne considérons pas non plus les éventuelles interactions avec les détergents utilisés au cours du lavage.

D'autre part, les effets associés aux mécanismes de friction ou de sudation (modification des propriétés des nanoparticules en contact avec l'organisme) ne seront pas traités. D'une manière générale, nous considérerons que le consommateur est exposé à la seule forme nanoparticulaire de l'argent Ag⁰. L'aspect complexe de l'oxydation de cette forme en argent ionique pour cette utilisation ne sera donc pas abordé dans cette partie.

Dans le cas de l'utilisation de ces chaussettes de marque A1, nous ne considérerons que l'exposition cutanée, qui est la voie d'exposition principale, comme cela a été détaillé dans la méthodologie. Cependant, il convient de mentionner qu'une mise en suspension des nanoparticules dans l'atmosphère est probable lors de la manipulation du produit. Nous ne disposons pas actuellement de données quantitatives suffisamment fiables (facteur d'émission dans l'atmosphère) qui permettraient de caractériser cette exposition de manière correcte.

Ainsi, étant donné l'état lacunaire des connaissances pour son établissement, ce scénario n'a pas la prétention d'aboutir à une caractérisation fine de l'exposition mais plutôt à un ordre de grandeur des données représentatives de l'exposition.

Durée et fréquences d'utilisation :

Afin de rendre compte d'un scénario « pire-cas », c'est-à-dire maximisant l'exposition humaine, associé à une utilisation dite normale de ces chaussettes, nous considérerons par hypothèse une

utilisation quotidienne et continue (24 h sur 24, 7 jours sur 7, toute l'année, pendant la vie entière) de ce produit.

En l'absence de données sur les quantités totales d'argent intégré au produit étudié, nous estimerons ce paramètre à partir de la concentration massique d'argent dans le produit (2,4 mg/g). La masse totale du produit n'étant pas connue, nous nous reportons à l'étude citée ci-dessus (Benn T.M. et Westerhoff P., 2008). Nous considérerons la masse la plus élevée référencée dans le Tableau 3, soit 60 g. Suivant cette hypothèse, la masse totale de nano-argent contenue par chaussette est environ :

$$2,4 \times 60 = 144.10^{-3} \text{ g}$$

L'agence de protection de l'environnement des États-Unis (US EPA) fournit des surfaces moyennes de pieds adultes³² : 0,122 m² pour la femme adulte et 0,137 m² pour l'homme adulte, par pied. Pour indication, nous considérons l'exposition à une paire de chaussette par individu consommateur (2 pieds). Toujours dans un souci de maximaliser l'exposition, nous tiendrons compte des données de plus faibles surfaces (et donc de concentrations surfaciques plus élevées). En considérant que l'ensemble des nanoparticules d'argent disponibles dans le produit est réparti uniformément en contact avec la peau, alors la concentration surfacique moyenne en particules d'argent est de :

$$(2 \times 144.10^{-3}) / (2 \times 0,122) = 1,18 \text{ g.m}^{-2} \text{ pour une femme ;}$$
$$(2 \times 144.10^{-3}) / (2 \times 0,137) = 1,05 \text{ g.m}^{-2} \text{ pour un homme.}$$

Malgré les nombreuses incertitudes liées à ce scénario, nous pouvons considérer que l'exposition ou la probabilité d'exposition du consommateur aux nanoparticules d'argent ne peut pas être négligée.

6.3.1.3 Définition du scénario de dispersion environnementale

L'estimation des impacts environnementaux occasionnés lors de l'utilisation de ces nouveaux textiles se confronte aux données peu nombreuses de la littérature se rapportant aux émissions de nanoparticules d'argent par ce type de produit (Borm P.J., Berube D.,2008; Luoma S.N.,2008; Nowack B.,2009). La quantification des émissions en fonction des divers compartiments environnementaux n'est pas réalisable. Néanmoins, les rejets aqueux d'argent intervenant durant l'étape de lavage de ces produits apparaissent aujourd'hui comme la problématique environnementale majeure attachée à la mise sur le marché de tels produits (Benn T.M. et Westerhoff P., 2008 ; Geranio L., 2009).

L'autorité de sécurité alimentaire d'Irlande³³ (FSAI, 2008) estime que 15 % des émissions d'argent dans l'eau en Europe seront issues des plastiques "biocides" et des textiles en 2010. Cette même autorité irlandaise indique que, compte tenu de l'expansion du marché des applications « nano-argent », la contribution de ce type d'émission deviendra substantielle. Sur ce point, la concentration attendue en nanoparticule d'argent dans les eaux a été évaluée à 0,03 µg/l en se basant sur l'étude de l'analyse du cycle de vie des produits intégrant des nanoparticules d'argent dans leur composition (Mueller N.C., Nowack B.,2008).

³² US EPA Exposure Factor Handbook (US EPA,2000)

: <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=209866>

³³ *The relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in the Food and Feed Industries* - 2008 <http://www.lenus.ie/hse/handle/10147/69382>

Les quelques travaux menés sur ce sujet (Benn T.M. et Westerhoff P., 2008; Geranio L., 2009) et les nombreuses déclarations commerciales suggèrent de plus une large hétérogénéité de comportement des articles disponibles pour cette gamme de produits durant leur usage. Ainsi, certains fabricants garantissent une préservation des propriétés anti-odeurs pour des conditions particulières d'entretien (propriétés garanties jusqu'à 20 lavages, s'ils sont effectués à la main à des températures inférieures à 30°C) tandis que d'autres affirment une persistance plus longue de ces propriétés pour des conditions d'usage plus standards (propriétés garanties jusqu'à 50 lavages effectués en machine jusqu'à des températures de 60°C). Il convient de souligner que ce dernier produit ne contient pas de l'argent sous forme nanoparticulaire mais intègre des sels d'argent. Cet exemple vient compléter la difficulté à répondre de façon générique à la question de l'exposition d'un consommateur utilisant un produit revendiquant intégrer du nano-argent.

Des chercheurs ont testé 9 textiles et ont trouvé que le pourcentage total d'argent perdu après lavage variait de 1 % à 45 %. Certaines particules ne sont en effet que faiblement attachées à la fibre, quand d'autres y sont intégrées³⁴.

Dans la pratique, les travaux de Benn *et al.* (Benn T.M. et Westerhoff P., 2008) confirment ces écarts de comportement (voir Tableau 3) et, ainsi, les incertitudes qu'ils impliquent dans l'évaluation des impacts environnementaux. Il convient de souligner, comme les auteurs de ces travaux, que la quantité d'argent perdue par lavage n'est pas corrélée à la quantité initialement présente. D'autres travaux³⁵ indiquent qu'après seulement 2 à 4 lavages, l'ensemble de l'argent présent avait été lessivé et était présent dans les eaux de lavage (produit contenant initialement un maximum de 1 360 µg d'argent par gramme et rejetant près de 650 µg d'argent dans 500 ml d'eau distillée). Enfin, point important, l'argent ainsi émis dans les eaux de lavage se présente aussi bien sous forme solide particulaire (Ag^0) que sous forme ionique.

Les autres travaux ayant cherché à caractériser l'altération de ces textiles modifiés soulignent également cette forte diversité de comportement observée entre les multiples produits étudiés. Parmi ces études, Geranio *et al.* soulignent le rôle dominant de la contrainte mécanique dans le phénomène d'altération de ces produits (perte des nanoparticules d'argent initialement intégrées aux fibres). Ainsi, pour un lavage représentatif d'un cycle en machine à laver (et non par simple trempage comme dans les travaux de Benn *et al.*), la plupart de l'argent initialement intégré au produit est retrouvé en solution (Geranio L., 2009).

Pour construire un scénario d'exposition de type « pire cas », et maximiser les émissions d'argent de telles chaussettes, nous considérerons que l'ensemble de l'argent initialement intégré au produit (144 mg par chaussette) est au final libéré dans l'eau de lavage. Comme souligné précédemment, l'argent libéré par ces textiles dans les compartiments aqueux se présente comme un mélange d'argent sous forme nanoparticulaire (Ag^0 métallique) et d'argent ionique, ceci certainement en raison de la forte solubilité de l'argent nanoparticulaire.

Ne disposant pas de statistiques précises concernant la consommation et l'utilisation de ces produits (fréquence de lavage), nous poserons l'hypothèse réaliste de l'achat (et donc de la consommation) de 10 paires de chaussettes nano-argent par consommateur et par an. La quantité annuelle d'argent dispersée dans les eaux de lavage par consommateur est estimée à l'aide du calcul simple suivant :

³⁴ <http://pubs.acs.org/cen/news/87/i40/8740notw6.html>

³⁵ <http://www.up3project.org/documents/Silver%20washing%20out%20of%20nano-silver%20products.pdf>

$$(144.10^{-3} \times 2) \times 10 = \mathbf{2,88 \text{ g / an / consommateur}}$$

En estimant de façon a priori maximaliste la part de marché de ce produit à 10 % en France, ces rejets hydriques s'exprimeraient de la manière suivante à l'échelle du territoire national³⁶ :

$$2,88.10^{-6} \times (65.10^6 \times 10 \%) = \mathbf{18,72 \text{ t/an}}$$

6.3.2 Evaluation du danger

6.3.2.1 Danger pour l'homme

6.3.2.1.1 Profil toxicologique général du nanomatériau

Toxicité

Aucun essai de toxicité aiguë et/ou chronique, de toxicocinétique par voie cutanée (voie d'exposition considérée), n'est disponible. À ce jour, aucune détermination de l'absorption cutanée *in vivo* selon la ligne directrice OCDE 427 n'est publiée dans la littérature.

Deux publications évaluant le potentiel de pénétration de la peau par des nanoparticules d'argent *in vitro* par la mesure du flux transcutané *ex vivo* ont été identifiées et analysées (Larese F.F., 2009; Filon F.L., 2007). Les auteurs déclarent avoir démontré pour la 1^{ère} fois que l'argent appliqué sous forme de nanoparticules enrobées avec du polyvinylpyrrolidone est capable de pénétrer dans la peau endommagée dans un système cellulaire de diffusion *in vitro*. Néanmoins, les résultats montrent que l'absorption de nanoparticules d'argent à travers la peau intacte ou endommagée est détectable mais très faible, après une exposition cutanée. Ces études ont utilisé des fragments de peau congelés, ce qui pourrait entraîner une sous-estimation de l'exposition interne, c'est-à-dire la quantité de nanoparticules qui est réellement absorbée lors d'une exposition externe et qui gagne la circulation systémique et pourrait alors atteindre d'autres organes.

Reprotoxicité :

Aucune donnée sur le potentiel reprotoxique ou sur une éventuelle bioaccumulation dans le (ou les) organe(s) cible(s) par exposition cutanée n'est disponible dans la littérature.

Génotoxicité

Concernant l'activité génotoxique, une seule étude est disponible dans la littérature; il s'agit du test du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse chez le rat réalisé par voie orale. Ce test, qui a été conduit selon la ligne directrice OCDE 471 et a suivi les recommandations de bonnes pratiques de laboratoire, s'est révélé négatif avec une exposition systémique démontrée (Larese F.F., 2009; Kim Y.S., 2008). En revanche, la forme chimique sous laquelle se présente l'argent (Ag⁰ nanoparticulaire ou argent ionique) n'a pas été déterminée.

³⁶ On assimilera par approximation les consommateurs de ce produit de consommation courante aux résidents français sur le territoire national, soit environ 65 millions d'individus (64 303 482 habitants au 1^{er} janvier 2009 pour la France métropolitaine et les DOM TOM d'après l'INSEE : http://www.insee.fr/fr/themes/detail.asp?reg_id=99&ref_id=bilan-demo&page=donnees-detaillees/bilan-demo/pop_age2b.htm)

Si la génotoxicité des nanoparticules d'argent a été étudiée *in vitro* par le test des comètes et dans le test du micronoyau (Larese F.F., 2009; Asharani P.V., 2009), ces essais ont été effectués sur des types cellulaires de diverses origines non représentatifs d'une exposition cutanée. Au cours de ces essais, les nanoparticules d'argent ont induit des lésions de l'ADN dépendantes de la dose aussi bien dans le test des comètes (augmentation de la fragmentation de l'ADN) que dans le test du micronoyau. L'augmentation significative de la fragmentation de l'ADN après traitement par des nanoparticules d'argent est rapportée également par des méthodes non standard telles que la mesure de la phosphorylation de la protéine γ -H2AX et le niveau de régulation de la protéine Rad5 qui indiquent directement ou indirectement la présence de cassures double-brin de l'ADN.

Génération d'ERO

Concernant la détermination du potentiel de génération d'espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (ERO/ERA), l'induction de stress oxydant et/ou de phénomènes inflammatoires, il apparaît clairement que les nanoparticules d'argent induisent un stress oxydant *in vitro* qui contribue aux modifications morphologiques cellulaires, au dysfonctionnement mitochondrial et à l'augmentation de la génération d'espèces réactives de l'oxygène d'une façon dose-dépendante, quelle que soit leur taille (Larese F.F., 2009; Hussain S.M., 2005; Hsin Y.H., 2008; Carlson C., 2008; Arora S., 2008; Arora S., 2009).

Les effets entraînés par l'argent sous sa forme ionique (apoptose et/ou nécrose par arrêt du cycle cellulaire) sont également constatés avec l'argent sous sa forme nanoparticulaire. La présence clairement démontrée d'agrégats à l'intérieur des mitochondries est impliquée dans la toxicité mitochondriale et les lésions de l'ADN *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (Arora S., 2008; AshaRani P.V., 2009). Les nanoparticules d'argent induisent donc des lésions oxydatives dans la cellule par des mécanismes directs et peuvent également induire des lésions indirectes de l'ADN par formation d'espèces réactives de l'oxygène liées à des réactions inflammatoires (Carlson C., 2008).

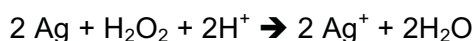
Il faut préciser que ces études ont utilisé des cellules de diverses origines qui sont souvent loin d'être représentatives d'une exposition humaine, cutanée de surcroît. Ces effets n'ont pas été confirmés *in vivo* sur le (ou les) organe(s) cible(s).

Discussion / Conclusion

D'après les données publiées, les nanoparticules d'argent induisent une cytotoxicité par un mécanisme qui semble identifié et principalement lié au stress oxydant avec induction d'apoptose à des doses faibles et de nécrose à des concentrations élevées, et qui pourrait être attribué à la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Les rares études de génotoxicité *in vitro* (tests des comètes et du micronoyau) démontrent un potentiel génotoxique *via* des cassures double-brin de l'ADN à des faibles concentrations au moins dans le test des comètes (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A ce niveau de concentrations, la production d'espèces réactives de l'oxygène a été démontrée (Asharani P.V., 2009). Le rôle des ERO dans la génotoxicité des nanoparticules d'argent, provenant à la fois des ions Ag^{2+} et de l'état nanoparticulaire, apparaît comme étant probable.

En effet, d'après Asharani *et al.* (Asharani P.V., 2009), il est possible que l'oxydation de surface des nanoparticules d'argent, au moment du contact avec le milieu de culture ou des protéines du cytoplasme, libère des ions Ag^+ qui pourraient amplifier la réponse. Les réactions entre H_2O_2 et les nanoparticules d'argent sont présumées être un des facteurs permettant la libération d' Ag^+ *in vivo* (les ions H^+ étant présents en abondance à l'intérieur des mitochondries dans lesquelles l'efflux de protons est l'événement principal dans la synthèse d'ATP) :



Asharani *et al.* proposent un mécanisme possible de toxicité qui implique la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale par les nanoparticules d'argent, conduisant à la production

d'ERO et à l'interruption de la synthèse d'ATP, entraînant à son tour des lésions de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire (voir figure ci-dessous). Les auteurs précisent que si de nombreux travaux ont porté sur l'argent, très peu encore ont porté sur son volet « nano ». De plus, les auteurs constatent que l'étude des voies et efficacités de pénétration dans le corps reste à faire pour le nano-argent, et que, de façon plus générale, l'étude de la transposition des connaissances « micro » à l'échelle nano reste à produire.

In vivo, le test du micronoyau sur moelle osseuse par voie orale chez le rat est clairement négatif.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées sur la différence des résultats obtenus dans des essais *in vitro* et *in vivo* :

- fixation de l'argent aux protéines qui diminue la biodisponibilité cellulaire ;
- argent sous forme non particulaire *in vivo* ;
- système de protection des espèces radicalaires efficace *in vivo* et dépassé *in vitro*.

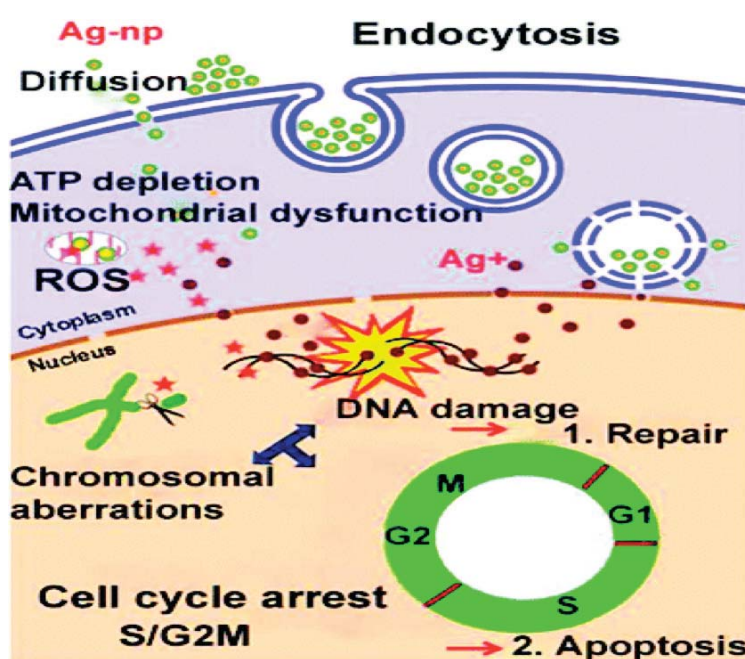


Figure 18 : Mécanisme possible de toxicité des nano-argent (Asharani P.V., 2009)

Concernant l'exposition, même si les résultats de l'absorption cutanée sont plutôt en faveur d'un accès très faible à la circulation systémique, un passage transcutané ne peut pas être totalement exclu. En termes d'évaluation des dangers, il apparaît donc prématuré de conclure, en raison du caractère discutable et en nombre limité des données de génotoxicité et d'exposition. Même si les premières études sont en faveur d'un risque systémique faible après exposition cutanée pour une peau saine, le manque de données empêche de réaliser une évaluation du danger correcte prenant également en compte le risque local.

Comme le concluent également Wijnhoven *et al.*, l'étude des voies et l'efficacité de pénétration dans le corps restent à documenter pour le nano-argent, ainsi que, de façon plus générale, l'étude de la transposition des connaissances « micro » à l'échelle nano (Wijnhoven S.W.P., 2009).

Afin d'évaluer correctement l'exposition, il faudrait donc pouvoir disposer d'études complémentaires, en particulier sur l'absorption cutanée :

- *in vitro* sur des fragments de peau non congelés en évaluant également le résiduel dans les cellules vivantes de peau, et/ou
- *in vivo* avec caractérisation de l'argent (forme soluble ou nanoparticulaire).

Ces études d'absorption par voie cutanée devraient mesurer, dans la circulation sanguine et dans les éventuels organes cibles, le niveau d'absorption de nanoparticules d'argent inchangées ainsi que le taux d'ions Ag^+ libérés à partir des nanoparticules d'argent. Si ces études de caractérisation démontraient que seules les nanoparticules d'argent pénètrent dans l'organisme, celles-ci devraient être considérées comme une nouvelle entité. Concernant les organes cibles, une étude de toxicité de 28 jours par voie orale a permis de mettre en évidence une augmentation significative et dépendante de la dose de la concentration en argent dans tous les tissus analysés, mais sans en connaître la forme (Kim Y.S., 2008). Après l'estomac (exposition directe), les reins, le foie et les poumons se sont révélés être les organes les plus exposés. Le système immunitaire pourrait également être une autre cible des nanoparticules d'argent (Wijnhoven S.W.P., 2009).

Dans tous les cas, si ces résultats montraient une absorption importante, *i.e.* une dose interne significative dans la circulation systémique, des études de toxicité (toxicité chronique, génotoxicité, *etc.*) seraient nécessaires pour étayer des conclusions. Parallèlement, afin de déterminer un mécanisme d'action, des essais spécifiques pourraient être réalisés, comme par exemple le test des comètes (qui s'est révélé le plus sensible) sur le(s) organe(s) cible(s), avec et sans FpG (détection des lésions oxydatives de l'ADN) mais aussi le test du micronoyau, la détermination de la ploïdie, la détermination du contenu en glutathion, l'analyse de la fonction mitochondriale, la recherche des effets pro-inflammatoires (exemple : NF-Kb), des facteurs d'inflammation (ex. : dosage des cytokines tels que TNF- α , IL6, MIP-1 α , β , *etc.*), des enzymes anti-oxydantes (ex. : catalase, SOD, GPX, *etc.*), *etc.*

Si l'absorption se révélait limitée, il serait toutefois nécessaire d'évaluer la génotoxicité au niveau de la peau en utilisant un système d'essai qui représente les cellules types de l'organe considéré, comme par exemple les modèles d'épidermes humains reconstitués.

6.3.2.1.2 *Evaluation du danger nano spécifique du produit fini*

Ne disposant pas de données spécifiques au produit étudié nous ne pouvons pas aujourd'hui conclure sur les dangers pour l'Homme associés à l'utilisation de ce produit A.

6.3.2.2 Danger pour l'environnement

6.3.2.2.1 *Profil écotoxicologique général du nanomatériau*

Les aspects écotoxicologiques des nanoparticules d'argent vis-à-vis de différentes espèces sont présentés ci-dessous : végétales, animales d'origine terrestre et/ou aquatique en milieu continental ou marin, bactéries.

Analyse par rapport au produit considéré :

Il convient de mentionner qu'aucun des travaux cités ci-dessous n'a testé l'écotoxicité de nanoparticules d'argent contenues dans le produit fini considéré. Il n'existe à ce jour aucune base de données sur les quantités de nanoparticules présentes dans l'environnement. De plus, d'un point de vue analytique, dans l'environnement, il n'est pas possible de distinguer les formes d'argent nanoparticulaires des autres, solubles par exemple (DEFRA,2009).

Données disponibles :

Une approche pour estimer les quantités potentielles de nanoparticules dans l'environnement est l'utilisation de modèles mathématiques décrits dans le manuel technique d'évaluation du risque chimique commun à l'Union européenne (*Technical Guidance Document*³⁷). Les concentrations en nanoparticules d'argent estimées (*Predicted Environmental Concentrations* ou concentrations

³⁷ <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/tgd/>

prévisibles dans l'environnement), au moyen de ces modèles, dans les compartiments aquatique et sédimentaire seraient comprises entre 0,01 et 0,32 µg / l ; 2 et 14 mg / kg, respectivement (Blaser S.A., 2008 ; Tiede K., 2009). Les travaux de Yoon *et al.*, (Yoon K.Y., 2007) ont montré chez l'espèce *Escherichia coli* une plus faible concentration d'effets observés (LOEC) élevée (40 mg/l) en comparaison avec un certain nombre d'études plus récentes. Mueller et Nowack (Mueller N.C. et Nowack B., 2008) proposent un facteur de sécurité de 1 000, ramenant la valeur de la PNEC à 40 µg/l. L'étude de Luoma (Luoma, 2008) est en accord avec cette proposition puisqu'elle a suggéré que les concentrations de nanoparticules d'argent sont peu susceptibles d'atteindre des valeurs supérieures à 1 µg/l quel que soit le compartiment de l'environnement. Toutefois, l'étude de Luoma citait des valeurs pour l'argent dissous, avec une LOEC à 10 ng/l, donc de plusieurs ordres de grandeur plus faible que dans l'étude de Mueller et Nowack. Si l'on considère (i) que toutes les nanoparticules d'argent modélisées dans l'étude de Mueller et Nowack se retrouveront sous formes d'argent dissous dans l'environnement, (ii) des valeurs de PEC d'environ 80 ng/l, pouvant atteindre environ 1 µg/l tel que décrit par Mueller et Nowack et Luoma; (iii) que 10 ng/l représente la valeur de la LOEC pour l'argent dissous, il est possible d'en conclure des valeurs de PEC / PNEC > 1. Il existe bien sûr des incertitudes dans ces calculs, en raison du manque actuel de connaissances. Dans ce scénario, les nanoparticules d'argent elles-mêmes représentent un danger limité car elles se dissolvent rapidement, mais l'argent dissous engendre des risques spécifiques qui peuvent être estimés en utilisant la procédure standard d'évaluation des risques. Un deuxième scénario pourrait être le suivant : les nanoparticules d'argent ne se dissolvent pas rapidement et dans ce cas, l'évaluation des risques se trouve limitée par les incertitudes liées à la forme nanoparticulaire de l'argent.

Il est bien connu que l'argent, sous la forme de cation soluble Ag⁺, est extrêmement toxique vis-à-vis des bactéries notamment, d'où son utilisation en tant qu'agent bactéricide. Il fait partie également des métaux les plus toxiques vis-à-vis des plantes, des invertébrés ou encore des poissons (Luoma, 2008).

Les nanoparticules d'argent qui sont incorporées dans de nombreux produits industriels (vêtements, nourriture, plastiques, *etc.*) possèdent aussi des propriétés bactéricides recherchées. Elles peuvent agir selon deux mécanismes principaux qui sont i) la formation d'ions super-oxydes O₂⁻ formés après adsorption de l'oxygène dissout sur les faces (100) et (111) (Akdin B., 2008), ii) la dérégulation des fonctions de transferts des ions Na⁺, H⁺, Ca²⁺, Cl⁻ *via* la forme soluble Ag⁺.

Les études sur la toxicité de l'argent nanoparticulaire sont nombreuses. Elles concernent aussi bien les souches bactériennes des milieux aqueux continentaux et marins, que des organismes comme les nématodes (*Caenorhabditis elegans*) ou les poissons (Zebrafish, Medaka, *etc.*). Des travaux apparaissent sur des colonies bactériennes présentes dans les milieux marins. Les approches génomiques se développent, en particulier la génomique fonctionnelle, afin de mieux cerner les mécanismes mis en jeu. Certaines études tentent de discerner les effets de nanoparticules d'argent de celles de la forme cationique Ag⁺ en équilibre, ainsi que les effets de la complexation de l'argent en surface des nanoparticules ou de l'adsorption sur les composés biotiques comme les algues sur la biodisponibilité. Cet aspect est encore très peu étudié malgré l'intérêt évident qu'il présente lorsque l'on veut modéliser la biodisponibilité d'un contaminant dans un milieu complexe (ex : modèle BLM).

Compte tenu des spécificités des différentes cibles biologiques étudiées en écotoxicologie, l'analyse de la littérature est présentée, suivant cette logique, par organisme cible.

Plantes

Récemment, Barrena *et al.* ont étudié les effets toxiques de quelques nanoparticules, en particulier l'argent (2 nm), vis-à-vis des plantes (*Cucumis sativus*, *Lactuca sativa*) et des microorganismes. Les tests de toxicité employés (test de germination, bioluminescence : Microtox® system, test de toxicité anaérobie) ont révélé une toxicité faible à nulle aux doses employées, jusqu'à 116 µg/m¹ selon le test. Des effets génotoxiques de nanoparticules d'argent (< 100 nm) à des concentrations pouvant atteindre 100 mg/l (25 – 100 mg/l), ont été observés chez l'oignon *Allium cepa*. Vis-à-vis des champignons, Kim *et al.* ont étudié l'activité anti-fongique et le mode d'action des

nanoparticules d'argent (3 nm) chez *Candida albicans*. Les résultats suggèrent que ces nanoparticules d'argent exerceraient leur activité anti-fongique en désorganisant la membrane cellulaire et en inhibant le processus de bourgeonnement normal, en raison de la destruction de l'intégrité membranaire (Barrena R., 2009; Kim Y.S., 2008; Kumari M., 2009).

Micro-organismes bactériens

Le stress oxydant comme mécanisme responsable de la toxicité des nanoparticules d'argent a été rapporté chez des microorganismes (Choi O., 2008). L'anion super-oxyde généré à la surface des nanoparticules d'argent ou l'ion Ag^+ issu de la dissolution partielle de nanoparticules d'argent pourraient être responsables des activités bactéricides (Pal S., 2007; Kim J.S., 2007). Hwang *et al.* ont étudié le mode d'action toxique de ces nanoparticules en utilisant un groupe de bactéries recombinantes bioluminescentes (Hwang E.T., 2008). Outre le fait que la présence de ces nanoparticules conduit à la production d'un radical super-oxyde, à l'origine des dommages des membranes cellulaires, une perturbation de la régulation de l'excrétion des ions Na, Cl, *etc.* est aussi observée, car les cations Ag^+ sont, au sein des corps cellulaires, fortement complexés aux protéines *via* des liaisons avec le soufre ou le phosphore. Vis-à-vis des souches sauvages *Escherichia coli*, la toxicité est mesurable à très faible concentration. La survie est affectée d'un facteur 10^7 en 15 heures en présence de 900 ppb³⁸ d'argent. Une étude récente (Blaser S.A., 2008) évalue entre 2 et 20 ppb les concentrations maximales sans effet (HONEC) selon les formes chimiques de l'argent. Les mécanismes sont associés à l'apparition de ruptures de la membrane cytoplasmique et à l'interaction avec des fonctions S et P au sein des protéines membranaires ou de l'ADN (Su H.L., 2009). Ces altérations membranaires pourraient faciliter l'entrée de nanoparticules à l'intérieur de la cellule. Chez *E. coli* et *P. aeruginosa*, une internalisation de nanoparticules inférieures à 10 nm a été montrée (Morones J.R., 2005), l'accumulation de ces dernières conduisant à des malformations cellulaires (Choi O., 2008). Néanmoins, aucune analyse physique n'a montré que ces nanoparticules étaient bien de l'argent métallique Ag^0 et non une autre forme issue de la précipitation des ions Ag^+ dans le corps cellulaire. L'inhibition de la nitrification de l'ion ammonium par des bactéries nitrifiantes est plus importante en présence de nanoparticules d'argent de tailles inférieures à 10 nm qu'en présence d'ions Ag^+ . Une corrélation a été montrée entre la production interne d'espèces radicalaires de l'oxygène et l'inhibition de la nitrification (Choi O., 2008).

Une étude unique, réalisée à partir d'un polyamide imprégné de nanoparticules d'argent, a montré un important relargage d'ions Ag^+ dépendant de la taille des particules d'argent et du temps. Des effets anti-microbiens importants sur *E. coli* et *Staphylococcus aureus* ont été mesurés au bout de 28 jours (Kumar R., Münstedt H., 2005).

Par ailleurs, le développement de la résistance bactérienne à l'argent, au même titre que leur résistance aux antibiotiques, doit être pris en considération. A l'heure actuelle, même si les mécanismes génétiques de la résistance bactérienne à l'argent ne sont pas encore complètement élucidés, en raison des nombreux mécanismes par lesquels l'argent affecte les bactéries (Chopra I., 2007), il est fort probable qu'une résistance à l'argent puisse se produire, à long terme et à des doses sub-létales de ce métal (Brett D.W., 2006).

Algues

Navarro a réalisé une étude comparative de la toxicité de l'argent sous forme nanoparticulaire (10 – 200 nm, moyenne : 40 nm) ou sous forme dissoute (AgNO_3) pour l'algue d'eau douce *Chlamydomonas reinhardtii* (Navarro E., 2008). En prenant en compte la concentration totale d'argent, les résultats ont montré que la toxicité (EC 50) était 18 fois plus importante pour AgNO_3 que pour les nanoparticules d'argent. Dans le milieu expérimental, aucune agrégation des nanoparticules n'a été observée par microscopie électronique à transmission. Toutefois, l'ion Ag^+

³⁸ *part per billion*, c'est-à-dire, en français, partie par milliards

mesuré dans les suspensions de nanoparticules d'argent ne pouvait pas à lui seul expliquer la toxicité observée. Seulement 1 % de l'argent (Ag^0) constituant les nanoparticules a été oxydé en ion Ag^+ , libéré dans le milieu. Estimée en fonction de la concentration en ions Ag^+ dans le milieu expérimental, la toxicité observée avec la suspension de nanoparticules d'argent était bien plus élevée en comparaison de celle obtenue avec AgNO_3 . Ces résultats suggèrent l'importance des interactions entre ces nanoparticules d'argent et les cellules algales. Inversement, pour l'algue marine (*Thalassiosira weissflogii*), la toxicité des nanoparticules d'argent (60 - 70 nm) serait due à la forme ionique de l'argent (Miao A.J., 2009).

Poissons

Pour le poisson japonais *Médaka* (*Oryzias latipes*), Chae *et al.* (Chae Y.J., 2009) ont montré une expression différentielle des gènes, induite en réponse à une exposition en laboratoire des poissons à des nanoparticules d'argent (49,6 nm, surface : 50,71 nm², de forme polyédrique) ou à l'argent sous forme ionique. Les résultats ont clairement mis en évidence que les nanoparticules d'argent (1 et 25 µg/l) conduisent à des dommages des cellules et de l'ADN ainsi qu'à un stress oxydant, les gènes impliqués dans les processus de détoxification métallique et de régulation du métabolisme étant également induits. En ce qui concerne les ions argent, ils sont responsables d'une induction de la réponse inflammatoire et des processus de détoxification métallique hépatique chez les poissons exposés. Cependant, d'une manière générale, ces réponses au stress sont plus faibles que celles induites par les nanoparticules d'argent.

Avec des embryons d'un autre poisson modèle, le poisson-zèbre (*Danio rerio*), Asharani *et al.* (Asharani P.V., 2009) ont montré une relation dépendante de la dose (5 – 100 µg/ml) de la toxicité (par exemple : taux de mortalité, retard d'éclosion) de nanoparticules d'argent (5 – 20 nm). La concentration létale moyenne vis-à-vis des organismes dépendant du stade de croissance des embryons exposés aux nanoparticules variait de 25 à 50 µg/m^l, les derniers stades de développement étant plus résistants à l'exposition aux nanoparticules. Cette toxicité serait spécifique aux nanoparticules d'Ag et non à l'ion Ag^+ , puisque l'exposition des embryons à différentes concentrations d' Ag^+ (2,5 – 20 nM) n'a engendré aucune anomalie dans leur développement. Les images en microscopie électronique à transmission ont montré que les nanoparticules d'argent étaient distribuées dans le cerveau, le cœur, le vitellus et le sang des embryons. Les vitesses de diffusion passive et d'accumulation des nanoparticules dans les embryons seraient probablement responsables des anomalies détectées dépendantes des doses d'exposition. Bar-Illan et Lee (Bar-Illan O., 2009; Lee S.W., 2009) ont comparé la toxicité de nanoparticules d'argent ou d'or de différentes tailles (3, 10, 50 et 100 nm) vis-à-vis d'embryons de ce poisson modèle (*Danio rerio*). La toxicité de l'argent estimée en taux de mortalité est plus importante que pour l'or. De plus, alors que les nanoparticules d'or induisent des effets toxiques sublétaux minimes, l'exposition aux nanoparticules d'argent génère une variété de malformations morphologiques embryonnaires. La toxicité des nanoparticules d'argent serait dépendante de la taille, à certaines concentrations, et ce pour certains temps d'exposition.

En revanche, des corrélations ont aussi été montrées entre la concentration des ions Ag^+ dissous en équilibre avec des nanoparticules d'argent recouvertes de PVP³⁹ vis-à-vis du poisson *Fundulus Heteroclitus* dont la mortalité embryonnaire suit la courbe de solubilité de l'argent particulière en fonction de la salinité.

Par contre, cette corrélation est moins évidente dans le cas de particules nanométriques d'argent recouvertes de gomme arabique (Auffan M. Å., 2009 ; Matson C.W. et Auffan M., 2009).

Nématodes

Des travaux très récents et en cours de l'Université de Duke (Auffan M. Å., 2009) semblent corréler la concentration en ions Ag^+ en équilibre avec les nanoparticules d'argent recouvertes de

³⁹ Poly vinyl pyrrolidone

molécules de PVP et la croissance du nématode *C.elegans* sauvage ou de la souche mutée Mtl2 sensible aux métaux.

L'impact de ces nanoparticules (14 - 20 nm) sur la survie, la croissance et la reproduction d'un nématode du sol (*C. elegans*) a récemment été étudié (Roh J.y., 2009). Les résultats ont montré une diminution du pouvoir reproducteur associé à un stress oxydant.

Milieux complexes

Enfin, d'un point de vue de l'impact environnemental des nanoparticules d'argent, compte tenu de leur effet bactéricide, la destruction de bactéries vitales importantes dans le fonctionnement et l'équilibre des écosystèmes (dégradation de matière organique, transformation, recyclage de nutriments) mais aussi du fonctionnement des boues activées des stations d'épuration des eaux usées est fortement redoutée. Récemment, Bradford *et al.* (Bradford A., 2009) ont étudié l'impact de nanoparticules d'argent (< 100 nm) sur la diversité génétique d'assemblages bactériens de sédiments estuariens. Les résultats n'ont pas mis en évidence de modifications significatives dans la diversité génétique des bactéries issues des sédiments naturels contaminés en laboratoire pendant 30 jours aux nanoparticules d'argent (0, 25, 1 000 µg/l).

Ces résultats sont à corréliser avec le travail de G.K Bielmyer (Bielmyer G.K., 2008) qui indique que les ions Cl⁻ protègent peu contre la toxicité du cation Ag⁺ vis-à-vis de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Au contraire, Nichols *et al.* (Nichols J.W., 2006) montrent que la complexation de Ag⁺ avec les ions chlorure Cl⁻ diminuerait la biodisponibilité des ions Ag⁺ dans les branchies du « Toad fish ». Par contre la complexation de l'ion argent à des matières organiques naturelles extraites de la « Suwannee river » ne semblait pas modifier sa biodisponibilité.

De plus, il est bien connu que les populations bactériennes environnementales se composent d'un grand nombre de souches résistantes aux antibiotiques. Bien que cette résistance soit grandement liée au relargage dans l'environnement d'antibiotiques issus d'activités agricoles et/ou humaines (Aarestrup F.M., 2000; Goni-Urriza M., 2000), d'autres facteurs comme les métaux lourds (Berg J., 2005; Wright M.S., 2006) peuvent également augmenter cette résistance aux antibiotiques. Une étude récente (Mühling M., 2009) a estimé le lien potentiel entre des nanoparticules d'argent et le développement de cette résistance aux antibiotiques. Les résultats ont montré que les nanoparticules d'argent n'induisaient pas d'augmentation de la résistance aux antibiotiques de bactéries naturellement présentes dans des sédiments estuariens. Les multiples facteurs abiotiques présents dans ces environnements, la salinité notamment, pourraient diminuer l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent (Lok C.N., 2007). Des études complémentaires sur le comportement des nanoparticules dans l'environnement et sur leur biodisponibilité s'avèrent indispensables quant à l'estimation des conséquences environnementales potentielles de l'utilisation de nanoparticules d'argent et de nanoparticules en général dans les produits finis.

Conclusion

D'une manière générale, à la lumière des travaux publiés, il est extrêmement difficile de prédire les impacts environnementaux des nanoparticules d'argent. Pourtant, l'argent nanoparticulaire intervient dans plus d'un quart des nano-produits existants sur le marché. Curieusement, l'argent nanoparticulaire n'a pas fait l'objet d'études importantes en France. Les résultats contradictoires quant à l'effet toxique montrent que les interactions entre les nanoparticules d'argent ou encore les ions Ag⁺ en équilibre et leurs complexes minéraux (SO₄, Cl⁻, HPO₄²⁻, etc.) ou organo-minéraux (matières organiques dissoutes, ou particulaires) jouent un rôle dans la biodisponibilité, mais les mécanismes réactionnels concernés ne sont pas encore totalement élucidés. Leur compréhension s'avère cependant fondamentale à la conception d'une modélisation correcte de la biodisponibilité.

Les recherches futures doivent impérativement utiliser des temps d'exposition plus longs et des doses réalistes sur le plan environnemental dans des micro ou mésocosmes, en corrélant les interactions des nanoparticules avec les composants du milieu, leurs transformations (dissolution, oxydo-réduction, complexation, etc.) et leur biodisponibilité (concentration de matière disponible pour les espèces vivantes présentes). Les études de toxicité doivent comprendre les mécanismes

en s'attachant à analyser aussi bien les aspects génomiques que la diversité des populations ou assemblages, la croissance et la fécondité.

6.3.2.2 *Evaluation du danger nano spécifique du produit fini*

Aucune donnée spécifique n'est disponible pour le produit A.

6.3.3 Evaluation du risque

6.3.3.1 Discussion des résultats

Cette étude montre que l'exposition aux nanoparticules d'argent contenues dans le produit A considéré ne peut pas être négligée, de même que le danger associé que ce soit pour l'Homme ou l'environnement.

Néanmoins, compte tenu de :

- la difficulté d'établir des scénarios réalistes pour l'Homme et l'environnement (co-exposition non considérée, nombreuses hypothèses posées, comportement du produit non connu, *etc.*) ;
- l'absence de données spécifiques au produit étudié A (caractérisation, données toxicologiques, écotoxicologiques, *etc.*),

le groupe de travail n'a pu réaliser une évaluation des risques à proprement parler pour le produit A. Ainsi, en l'absence d'évaluation, le risque ne peut pas être exclu.

6.3.3.2 Discussion et identification des incertitudes

La caractérisation du produit A est mal connue. Ainsi, il existe de nombreuses incertitudes sur la ou les formes chimiques auxquelles l'homme et l'environnement sont exposés (forme ionique, métallique, *etc.*) ainsi que sur le comportement de l'argent.

Scénario homme :

En l'absence d'études (éco) toxicologiques spécifiques au produit A, l'identification des dangers a été réalisée sur la base d'études génériques (nanoparticules d'argent non spécifiques au produit A).

Les seules données disponibles (deux études *in vitro*) ne permettent pas d'exclure le passage transcutané chez l'homme. De plus, les études de toxicité chronique et des études standards de génotoxicité, de reprotoxicité, *etc.* font défaut pour caractériser l'exposition par voie cutanée.

Les propriétés biocides du nano-argent contenu dans le produit, devraient être considérées pour l'évaluation des risques. Cette remarque est également valable pour l'environnement.

Ce produit de consommation étant destiné à une large diffusion, il apparaît nécessaire de porter une attention particulière aux populations dites sensibles.

Scénario environnement :

La considération d'études génériques sur des nanoparticules de synthèse (et non sur le produit étudié) rend périlleuse la transposition des conclusions au produit A étudié.

De plus, la compréhension des mécanismes est à un stade très précoce et les conclusions de ces études sont susceptibles de se modifier au fur et à mesure que l'information devient disponible.

6.3.3.3 Conclusion

Pour le produit A considéré

Pour l'homme et l'environnement, si le risque lié à l'utilisation du produit A ne peut pas être estimé, il ne peut pas être exclu.

Pour le cas général des nano-argent

Compte tenu :

- du nombre en constante augmentation de produits de consommation intégrant des nanoparticules d'argent ;
- de la diversité de l'exposition ;
- et du danger avéré chez certaines espèces.

l'argent utilisé sous ses différentes formes chimiques constituera certainement un risque pour l'environnement, même s'il n'est pas mesurable actuellement.

6.4 Ciments et dioxyde de titane

La photocatalyse est généralement décrite comme une réaction photo-chimique et catalytique qui a lieu en surface d'un solide, principalement un semi-conducteur (Fujishima A., 1999; Pelizzetti E., Serpone N. 1986; Serpone N., Pelizzetti E. 1989). Le terme photo-chimique signifie que cette réaction n'a lieu qu'en présence de lumière et le terme catalytique indique que le catalyseur (le solide) est régénéré. Cette réaction est initiée par la transition d'un électron depuis la bande de valence (BV) vers la bande de conduction (BC) sous l'effet d'un rayon lumineux possédant une énergie $h\nu$ supérieure ou égale à la différence d'énergie entre les deux bandes.

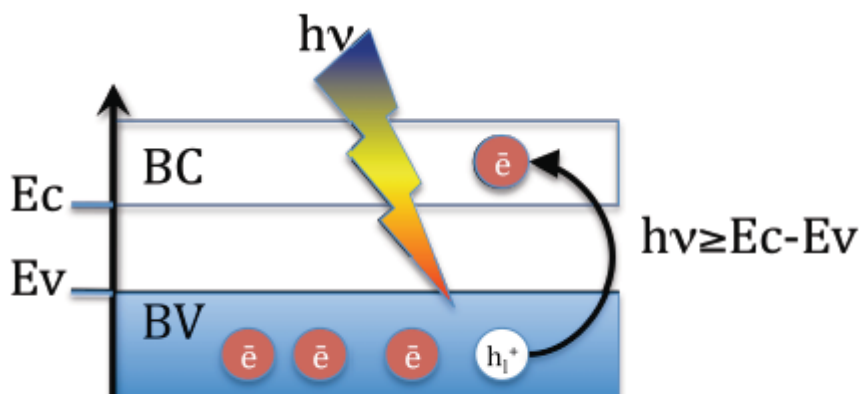


Figure 19 : Création de la paire électron e^- / trou h^+ suite à l'irradiation par un faisceau lumineux d'énergie ($h\nu$) supérieure ou égale à la différence entre l'énergie de la bande de conduction (E_c) et la bande de valence (E_v).

En surface, les électrons et les trous disponibles peuvent réagir avec des espèces accepteuses et donneuses pour former des radicaux. Deux réactions auront lieu : une réaction d'oxydation liée au trou photogénéré et une réaction de réduction liée à l'électron photo-généré. Différentes espèces oxydantes appelées ERO peuvent donc apparaître, comme le montrent les équations ci-après en milieu aqueux.

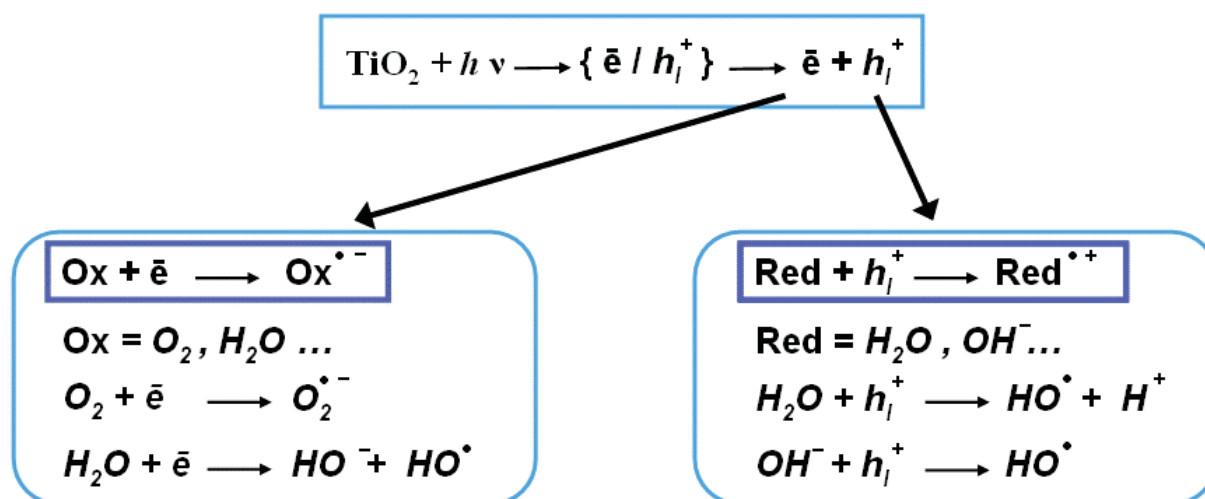


Figure 20 : réactions d'oxydation et de réduction pouvant avoir lieu en surface de TiO₂

La paire électron/trou peut réagir avec i) soit des oxygènes terminaux faisant partie du solide, ii) soit avec des composés externes adsorbés (molécules d'eau ou composés organiques).

Effet de la taille

Les premières études menées dans les années 1960 ont montré que l'activité photocatalytique dépendait de la nature minéralogique du solide. Kato et Mashio ont indiqué que l'activité photocatalytique de l'anatase pour oxyder des hydrocarbures et des alcools était supérieure à celle du rutile (Kato S. et Mashio F., 1964).

Or, la stabilité des trois formes du TiO₂ (anatase, brookite, rutile) dépend de la taille (Ranade M.R., 2002; Zhang H., Banfield J.F., 2000). Il a été récemment montré que le rutile est la phase la plus stable thermodynamiquement pour des particules supérieures à 35 nm, l'anatase pour des tailles inférieures à 11 nm, alors que la brookite se trouve être la plus stable dans la gamme de taille intermédiaire. La raison exacte de cette différence n'est pas totalement élucidée mais doit certainement être liée à la nature des faces cristallographiques exposées. Outre cet effet indirect de la taille, plusieurs auteurs (Almquist C.B., Biswas P., 2002; Wang C.B., Zhang W.x., 1997) ont montré qu'il existait un *optimum* de taille pour la photo-oxydation de substrats organiques pour un même polymorphe. Almquist et Biswas (2002) ont défini cet *optimum* entre 25 et 40 nm alors que Wang *et al.* (1997) situent cet *optimum* aux alentours de 11 nm. Les auteurs considèrent qu'il existe des effets s'opposant entre une surface spécifique importante lorsque la taille diminue et donc une plus grande quantité de molécules adsorbées, et une plus grande proximité des paires électrons - trous aboutissant à un taux de recombinaison élevé avant toute réaction de surface. L'énergie de transition de bande définie ci-dessus ($E_c - E_v = E_b$) peut aussi être affectée par la modification de taille des photo-catalyseurs (Almquist C.B. et Biswas P., 2002; Linsebigler L., 1995; Nozik J.A., 1993). Ceci a été montré expérimentalement à plusieurs reprises dans le cas de différents matériaux, comme par exemple l'anatase, où la valeur de E_c varie de 3,2 à 3,5 eV pour des particules inférieures à 12-16 nm. Une augmentation de l'énergie E_c a pour conséquence d'augmenter la réactivité photo-catalytique en augmentant le potentiel d'oxydo-réduction qui est le paramètre clé du transfert d'électron.

Les ciments contenant du dioxyde de titane TiO₂ à l'échelle nanométrique (nano-ciments) sont proposés pour des applications dans les bétons, mortiers et coulis lorsqu'un utilisateur souhaite profiter d'un effet autonettoyant en surface ou encore d'assainissement atmosphérique.

L'incorporation de ces adjuvants nanométriques sous la forme cristalline anatase apporte en effet des propriétés photocatalytiques permettant la formation de substances très oxydantes capables

de décomposer une large variété de matières organiques et inorganiques. Le ciment acquiert ainsi des capacités autonettoyantes d'intérêt pour la maintenance et la durabilité des bâtiments ainsi que des capacités de dépollution de l'air en contact. La nature photocatalytique de ces effets, accélérant le lent processus d'oxydation des polluants, implique un contact direct de la couche contenant le nano-ciment avec l'extérieur (exposition à la lumière UV) pour pleinement profiter de l'effet « nano-photo-catalytique » désiré.

Cette application particulière aux matériaux de construction est directement issue du projet européen PICADA⁴⁰ dont l'objectif était précisément la mise au point d'un revêtement de façade pour les bâtiments présentant des propriétés d'auto nettoyage et de dépollution de l'air. Initié au début des années 1990 dans le cadre du cinquième PCRD, ce projet a rassemblé quatre partenaires industriels, deux centres techniques (en charge de l'évaluation des performances techniques des produits réalisés) et deux laboratoires universitaires (en charge de la modélisation des approches expérimentales). On notera que ces travaux ont essentiellement été portés sur l'évaluation des performances techniques et environnementales (relatives aux cahiers des charges et normes en vigueur pour ce secteur) de ces nouveaux matériaux, la question des risques sanitaires ou environnementaux spécifiques au caractère dimensionnel « nano » du dioxyde de titane intégré au produit n'étant pas alors encore abordée de manière explicite.

6.4.1 Evaluation de l'exposition

Le produit commercial sélectionné pour l'étude de cas est le produit B. Il correspond à du ciment contenant des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂). Le groupe de travail, ne disposant pas de données quant à la caractérisation des nanoparticules de TiO₂ présentes dans le produit B, a posé l'hypothèse que le dioxyde de titane présent dans le produit se présente principalement sous forme cristalline anatase (brevet du produit B concerné). Par ailleurs, les dimensions nanométriques ne sont pas connues.

Afin d'identifier correctement les produits contenant ces ciments modifiés et les applications associées, une analyse détaillée de leurs utilisations a fait l'objet d'une étape préliminaire. Les scénarios présentés ci-dessous, considérés comme raisonnablement envisageables, ont été retenus au cours de cette analyse.

Dans la suite de ce document, nous présentons les scénarios d'exposition à ce produit les plus probables pour un mode d'utilisation dit « normal », c'est-à-dire conforme aux prescriptions d'emploi, et ceci à différentes étapes de son cycle de vie. Ils concernent tous des applications de ciments sur des surfaces comme des murs ou des chaussées. Selon la méthodologie mise en œuvre par le groupe de travail, la voie majoritaire d'exposition considérée pour l'ensemble des scénarios est la voie respiratoire. L'ingestion accidentelle de ciment ainsi que l'exposition par voie cutanée lors de la manipulation des ciments ne seront donc pas étudiées.

La littérature disponible relative aux flux et volumes de nano-ciments produits ou utilisés s'avère très limitée. Ainsi, pour l'établissement des scénarios suivants, ne disposant pas de données spécifiques au produit B considéré, il sera considéré une teneur de 0,3 à 10 % en masse de TiO₂ nanostructuré dans le ciment (Pepe C., 2004).

Dans l'air, les forces de diffusion des nanoparticules sont considérées comme plus importantes que celles observées pour les particules de tailles suprananométriques et expliquent des comportements qui se rapprochent de celui d'un gaz ou d'une vapeur. Ceci les différencie des particules plus grosses pour lesquelles les forces inertielles tendent à dominer. La taille des

⁴⁰ <http://www.picada-project.com/domino/SitePicada/Picada.nsf?OpenDataBase>

particules doit absolument être considérée pour l'évaluation de l'exposition. La vitesse à laquelle les particules diffusent dans l'air est déterminée par leur coefficient de diffusion qui est inversement proportionnel à leur taille. Les nanoparticules diffuseront beaucoup plus rapidement que celles dont l'échelle est de l'ordre du micromètre. Ainsi, des nanoparticules ne resteront pas localisées dans la zone d'émission ; elles diffuseront rapidement et pourront se retrouver à une grande distance d'une source et potentiellement exposer plusieurs individus localisés à distance de la zone d'émission. De plus, les particules d'un aérosol subiront une multitude de collisions qui conduiront à leur agglomération ou coagulation et à une augmentation de leur diamètre modifiant en conséquence les paramètres de diffusion de l'aérosol. La vitesse à laquelle les particules s'agglomèrent dépend de leur concentration en nombre et de leur mobilité. La coagulation de nanoparticules conduira rapidement à la formation de plus grandes particules en concentration plus faible et qui persisteront plus longtemps parce que leur mobilité sera réduite. Par ailleurs, la plupart des nanoparticules une fois agrégées ou agglomérées sous la forme de poudre ne seront pas faciles à dissocier ou à re-suspendre dans l'air.

C'est pourquoi l'extrapolation à partir des données sur des particules plus grosses pour évaluer le devenir des nanoparticules de TiO_2 pourrait manquer de pertinence. Ne disposant pas des caractéristiques des nanoparticules de TiO_2 dans le produit B considéré (taille, surface spécifique, fonctionnalisation, état des nanoparticules de TiO_2 dans le ciment, surface nanostructurée conservée si formation d'agglomérats, etc.), il est très difficile de prévoir leur comportement.

De plus, les co-expositions et interactions potentielles avec d'autres particules présentes dans l'air (pollution atmosphérique, autres particules générées lors des travaux de voirie ou de bâtiment) ne seront pas prises en compte, bien qu'elles puissent influencer le devenir des nanoparticules de TiO_2 . La génération d'autres composés par photocatalyse ne sera pas non plus considérée dans l'analyse.

6.4.1.1 Définition de scénarios d'exposition pour l'homme

6.4.1.1.1 *Ciments dans leur forme poudreuse*

Scénario d'exposition lié à l'utilisation de ciment

D'emplois principalement destinés aux travaux publics et à la réalisation de bâtiments⁴¹, les ciments se restreignent géographiquement presque essentiellement aux zones de construction dont les accès sont usuellement limités pour la population générale. L'exposition à ces produits durant leur usage s'avère une problématique concernant presque essentiellement le cadre professionnel. Par conséquent, la population générale n'est en principe que peu exposée au ciment durant son utilisation.

Néanmoins, lors des travaux de voirie ou de bâtiment, il peut arriver que le passage à proximité de zones de construction génère des situations d'exposition par l'envol de ciment. Le fait de considérer l'exposition pour ce scénario est fondé sur l'hypothèse d'une répartition suffisamment large de l'utilisation de ce produit pour justifier la possibilité d'une réelle exposition de la population générale. Etant donné le manque de données et les incertitudes sur le devenir des nanoparticules, voire des agglomérats de nanoparticules de TiO_2 après leur émission dans l'atmosphère, le scénario selon lequel la population générale serait exposée à travers la dispersion environnementale durant la réalisation de ce type de travaux n'a pu être étudié.

A l'inverse du scénario précédent impliquant la population générale exposée *via* le passage à proximité de zones de construction, pour lequel l'exposition s'avère moins probable, les modalités d'exposition pour un scénario correspondant à un bricoleur utilisant du nanociment contenant des nanoparticules de TiO_2 sont mieux définies. Le bricoleur pourrait être facilement exposé à chaque étape de manipulation du ciment (déballage des sacs de ciment, utilisation d'un mélangeur, etc.).

⁴¹ <http://www.infociments.fr/publications/industrie-cimentiere/rapports-activite/ra-g03-2008>

En raison de l'absence de données disponibles spécifiques à ce cas, l'exposition du bricoleur pourra être assimilée à celle du travailleur dans un cadre professionnel pour ce qui est de l'amplitude de l'exposition. De plus, le bricoleur dispose rarement des mêmes moyens et connaissances quant à sa protection, ce qui pourrait favoriser une exposition accrue. Etant donné la proximité du sujet exposé à la source d'émission et donc le faible laps de temps entre l'étape de libération des nanoparticules entraînées par la manipulation du produit et l'exposition possible, on considérera par hypothèse que le sujet est effectivement exposé à des nanoparticules de dioxyde de titane, les phénomènes classiques de dispersion/agglomération des particules pouvant être moindres. Cependant, le groupe de travail ne disposant pas de données pertinentes sur des travailleurs, aucune estimation n'a pu être réalisée.

6.4.1.1.2 Produits contenant du ciment

Les applications de nano-ciments se trouvent avant tout dans des bétons, mortiers, coulis et briques utilisés pour la construction de murs et le revêtement de surfaces pavées. Les expositions à ces produits peuvent être discriminées suivant plusieurs critères, parmi lesquels :

- groupe de consommateur (utilisateur et bricoleur) ;
- objet d'utilisation (murs et sol) ;
- occasion de libération (usure quotidienne, travaux, déconstruction).

Concernant les émissions dans l'atmosphère de nanoparticules de dioxyde de titane, entraînées par l'usure quotidienne de constructions habitables à base de ciments en contenant, celles-ci sont usuellement considérées faibles, cela d'autant plus que la fonction photocatalytique recherchée doit être normalement conservée pour une durée supérieure à 10 années (Nanoforum Novembre 2007). L'exposition à une atmosphère d'un environnement urbain constitué d'une multitude de constructions bénéficiant de cette technologie suscite néanmoins une interrogation légitime, l'exposition de la population à un tel environnement se posant comme une question de santé publique. Cependant, en raison des trop fortes incertitudes et inconnues associées à un tel scénario (configuration urbaine supposée, comportement de ces substances nanoparticulaires dans l'atmosphère à long terme non connu, etc.), ces expositions ne seront pas examinées dans cette étude.

Parmi les scénarios retenus, nous distinguons 3 cas :

- exposition liée à l'usure des routes construites à partir de ciments TiO_2 (produit B) ;
- exposition liée à la réalisation de travaux dans des bâtiments construits à base de TiO_2 (produit B) ;
- exposition du bricoleur suite à des travaux sur des produits contenant le produit B.

Exposition liée à l'usure des routes

Dans le cas d'utilisation de briques ou de béton de nano-ciment pour des routes empruntées par des voitures, l'usure de revêtement durant l'hiver pourrait constituer une part significative de l'exposition de la population générale aux métaux lourds contenus dans le revêtement routier (Lindgren A., 1996). Néanmoins, l'usure est fortement dépendante des conditions d'usage. Ainsi, elle serait par exemple considérablement augmentée si les voitures étaient équipées de chaînes à neige ou de pneus cloutés comme elles le sont plus régulièrement en Europe du Nord.

A titre indicatif, plusieurs études ont examiné les concentrations de métaux lourds dans des particules fines (Hueglin C., 2005; Riediker M., 2003), et les concentrations de titane lié à des particules fines ($\text{PM}_{2,5}$) sont habituellement considérées comme faibles (Tableau 4).

Tableau 4 Concentrations de titane (Ti élémentaire) dans des poussières fines (PM_{2,5}) prélevées à l'intérieur des voitures, à côté des routes et dans un site urbain loin des routes. Les chiffres sont indiqués en nano-grammes par mètre-cube (ng/m³, 1 µg = 1000 ng) (Riediker M., 2003).

Intérieur des voitures				Site urbain loin des routes				À côté des routes			
moyenne	Écart-type	min	max	moyenne	Écart-type	min	max	moyenne	Écart-type	min	Max
10,4	9,2	0,0	40,4	7,0	5,7	0,0	18,5	10,3	6,5	2,1	29,4

Exposition du bricoleur suite à des travaux sur des produits contenant le produit B

Concernant la fréquence et la durée d'exposition, nous considérerons que, pour la majorité des bricoleurs, l'activité de bricolage justifiant l'exposition n'est que ponctuelle donc aiguë. De la même façon, étant donné la proximité du sujet exposé à la source d'émission et donc le faible laps de temps entre l'étape de libération des nanoparticules entraînées par la manipulation du produit et l'exposition possible, on considérera par hypothèse que le sujet est effectivement exposé à des nanoparticules de dioxyde de titane, les phénomènes classiques de dispersion/d'agglomération des particules pouvant être moindres. Pour estimer le niveau d'exposition dans le cas du bricoleur, nous pouvons employer des valeurs d'exposition professionnelles aux poussières de béton connues pour les lieux de travail (Chisholm J., 1999; Linch K.D., 2002) en considérant également l'hypothèse réaliste selon laquelle, le plus souvent, les bricoleurs ne disposent que de peu de connaissances sur les mesures de protection. Ces valeurs restent néanmoins très incertaines et ne doivent pas être considérées comme une estimation fiable de l'exposition.

Tableau 5 Approximation d'une concentration en nanoparticules de TiO₂ à partir des émissions de poussières de travaux.

Scénarios pour Bricoleurs	Niveau d'exposition	Référence
<i>Libération des (nano) particules de provenance de murs</i>		
Travaux (Perçage de trous, etc.)	Air: 7,6 à 253,2 µg/m ³ /min Exposition considérée comme aiguë	Estimation à partir de 20, 54 mg/m ³ /min de poussière inhalable, dont 0,3 à 10 % de TiO ₂ (Linch K.D., 2002)

6.4.1.1.3 Fin de vie des produits contenant du nano-ciment

La fin de vie des produits contenant du nano-ciment correspond en principe à la destruction des (surfaces de) murs et des chaussées. Nous pourrions donc envisager une exposition de la population générale lors du passage à proximité d'une zone de déconstruction.

De manière identique à celle pour les travaux de réparation (paragraphe précédent), nous considérons par hypothèse que les travaux de destruction de murs seront moins fréquents, mais que le temps d'exposition pourra être considéré plus long.

6.4.1.2 Définition du scénario de dispersion environnementale

A l'heure actuelle, les quantités de nano-ciment produit et appliqué dans des différents bâtiments ne sont pas connues. Bon nombre d'interrogations subsistent de plus sur les caractéristiques de dégradation et durées de vie des constructions réalisées avec ces nano-ciments. Certaines données indiquent que celles-ci pourraient être encore plus stables (Lindgren Å.s., 1996). Par conséquent, nous ne disposons pas, à l'heure actuelle, de données suffisamment étoffées pour pouvoir estimer les quantités dispersées dans l'environnement.

Deux travaux peuvent néanmoins être cités :

- un travail sur la résistance à l'abrasion des bétons contenant des nanoparticules de TiO_2 (Li H., 2006). Les bétons sont fabriqués à partir de ciment Portland et de sable de 5 - 25 mm puis sont mélangés à des nanoparticules de TiO_2 d'environ 15 nm à des pourcentages en poids par rapport au liant de 1, 3 et 5 %. Des essais normalisés de résistance à la compression et à la flexion ont été associés à des essais d'abrasion. Les résultats montrent, après 28 jours de cure, une diminution de la résistance à la compression et à la flexion avec l'augmentation de TiO_2 dans les bétons corrélativement à une diminution de la résistance à l'abrasion (indice de surface et indice de bordure). L'interprétation donnée par les auteurs est une diminution de la formation des particules de CSH^{42} et une microstructure différente en présence de TiO_2 ;
- un travail sur l'émission de nanoparticules de TiO_2 dans les eaux de ruissellement et issues des façades extérieures (Kaegi R., 2008). Les auteurs ont extrait des particules présentes dans les eaux de ruissellement de la ville de Dubendorf (Suisse) provenant de deux immeubles récents, traités avec des peintures contenant des nanoparticules de TiO_2 . Les résultats obtenus et analysés par microscopie électronique à transmission et ICP-MS montrent la présence de particules de TiO_2 de taille autour de 150 nm, formées d'agrégats de particules plus petites. La source des particules de TiO_2 des eaux de ruissellement semblent être les façades des immeubles. Les concentrations en Ti atteignent 600 $\mu\text{g/l}$, associées à des concentrations en Ca (20 - 40 mg/l), Al (1 - 5 mg/l), et Si (1 - 10 mg/l) importantes.

L'absence de données de caractérisation relatives au produit B étudié, et de connaissances suffisantes quant au devenir des nanoparticules de TiO_2 après émission, empêchent toute estimation de ce à quoi l'environnement sera réellement exposé et en quelle quantité.

6.4.2 Evaluation du danger

6.4.2.1 Danger pour l'homme

6.4.2.1.1 *Profil toxicologique général du nanomatériau*

Parmi les nanoparticules inorganiques, le TiO_2 a été abondamment étudié.

Les études épidémiologiques n'ont pas permis de démontrer une augmentation du risque de morbidité ou de mortalité liées au cancer pulmonaire chez les travailleurs affectés à la production de TiO_2 (NIOSH, 2005).

Aucune étude n'a été faite concernant des travailleurs manipulant ou utilisant le TiO_2 . Le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) considère que les preuves sont actuellement insuffisantes pour désigner le TiO_2 comme un agent cancérigène potentiel pour la voie inhalée.

Le NIOSH a élaboré en 2005 un document de travail qui fournit des recommandations concernant l'exposition professionnelle au TiO_2 . Il recommande une valeur limite d'exposition de 0,1 mg/m^3 pour les particules ultrafines de TiO_2 de dimensions nanométriques, alors que la limite recommandée pour les particules fines de TiO_2 est de 1,5 mg/m^3 (pour une exposition jusqu'à 10 h par jour pendant une semaine de travail de 40 h). Cette différence reflète l'influence de la surface spécifique dans la toxicité des particules ultrafines. Le respect de ces recommandations devrait diminuer le risque de cancer pulmonaire à moins de 1 sur 1 000 chez les travailleurs exposés au TiO_2 (NIOSH, 2005).

⁴² Silicates de calcium hydratés (Hydrated Calcium Silicates)

L'organisme a conclu que :

- l'effet tumorigène de l'exposition au TiO₂ ne semble pas être lié au produit ou à une action directe, mais serait plutôt fonction de la dimension des particules et de leur surface qui agirait comme un mécanisme génotoxique secondaire (non spécifique) associé à une inflammation chronique et une prolifération cellulaire ;
- les indices indiquent que l'exposition professionnelle à des faibles concentrations de TiO₂ produit un risque négligeable de cancer du poumon chez les travailleurs, il n'est pas possible de déterminer si l'exposition à des fortes concentrations est cancérigène chez l'humain ;
- les limites d'expositions recommandées peuvent permettre de réduire les risques qui peuvent être associés au développement de l'inflammation pulmonaire et du cancer (1,5 mg/m³ pour les particules fines et 0,1 mg/m³ pour les particules ultrafines; 10 h pendant une semaine de travail de 40 h).

Selon le NIOSH, il y a peu d'effets reliés au TiO₂ dans les études de cas et les études épidémiologiques ne fournissent pas d'indice évident d'une augmentation de la mortalité par cancer ou de la mortalité chez les travailleurs exposés aux poussières de TiO₂. Le NIOSH considère que les indices sont insuffisants pour classer le TiO₂ comme « cancérigène professionnel potentiel ».

De son côté, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) considère que les preuves de la cancérigénicité du TiO₂ chez l'homme sont insuffisantes, mais qu'elles sont suffisantes chez l'animal (IARC, 2006). Le TiO₂ est donc considéré comme cancérigène possible pour l'homme (groupe 2B) par le CIRC.

En février 2006, un groupe consultatif du CIRC pour la révision des monographies a réévalué la classification du dioxyde de titane qui était considéré comme inclassable quant à sa cancérigénicité pour l'homme (groupe 3). L'organisme l'a re-classifié comme « agent cancérigène possible pour l'homme (groupe 2B) ».

Le CIRC a analysé les données épidémiologiques disponibles, soit trois études de cohorte (Europe et États-Unis) et une étude cas-témoins d'une population (Montréal). Ces études n'ont pas permis de mettre en évidence une association entre l'exposition au TiO₂, telle qu'elle était susceptible de se produire au cours des dernières décennies en Europe et en Amérique du Nord, et le risque de cancer. Cependant, le CIRC mentionne que les études souffraient de limitations méthodologiques (par exemple concernant la classification des expositions, la dimension des particules, l'enrobage).

Le TiO₂, sous forme pigmentaire et ultrafine, a été testé pour sa cancérigénicité par diverses voies d'exposition (inhalation, orale, intra-trachéale, injections) chez plusieurs espèces animales (rat, souris). Une augmentation des tumeurs bénignes et malignes a été constatée chez le rat femelle (inhalation) ainsi qu'une augmentation des adénomes pulmonaires à forte dose chez les rats femelle et mâle. Deux autres études par inhalation chez le rat et une chez la souris se sont avérées négatives. Aucune augmentation de la fréquence de tumeur cancéreuse n'a été observée par les autres voies chez le rat et la souris.

L'évaluation du CIRC a tenu compte de considérations mécanistes et d'autres données pertinentes (Baan R., 2006) :

- les données humaines disponibles par inhalation concernent des rapports de cas qui ont montré un dépôt dans le tissu pulmonaire et les ganglions lymphatiques ;
- une étude clinique par ingestion de fines particules de TiO₂ a montré une absorption gastro-intestinale dépendante de la dose avec une grande variation inter-individuelle des concentrations sanguines ;

- les études chez les rongeurs ont montré une atteinte dépendante de la dose de la clairance⁴³ par les macrophages alvéolaires ;
- la clairance des particules ultrafines de TiO₂ était plus lente que celle des particules fines ;
- chez les rongeurs, la toxicité pulmonaire est plus forte après une exposition aux particules ultrafines qu'après une exposition aux particules fines (sur une base de masse). Ces différences seraient reliées à la charge pulmonaire en termes de surface de particules, et sont considérées comme résultant de l'atteinte de la phagocytose et la séquestration des particules dans le tissu interstitiel ;
- les particules ultrafines de TiO₂ inhibent la phagocytose des macrophages alvéolaires humains *in vitro* à une concentration massique à laquelle cet effet n'est pas produit pour les particules fines ;
- l'induction *in vitro* de dommages à l'ADN, qui suggère la génération d'espèces réactive d'oxygène, est plus forte pour les particules ultrafines que pour les particules fines.

L'ACGIH (ACGIH, 2005) classe le dioxyde de titane comme substance non classifiable comme cancérigène pour l'homme (groupe A4).

L'ACGIH a évalué le dioxyde de titane (TiO₂) comme une « substance non classifiable comme cancérigène pour l'homme » en se basant sur l'absence d'indice concluant entre l'exposition au dioxyde de titane et le cancer, ainsi que sur des résultats négatifs ou non concluants concernant l'activité cancérigène chez les animaux.

6.4.2.1.2 Evaluation du danger nano spécifique du produit fini

La recherche bibliographique a été réalisée en retenant les essais menés par voie inhalée qui correspondent à la voie d'absorption majoritaire retenue chez l'Homme pour le produit B, et avec l'utilisation de nanoparticules TiO₂ anatase (enrobées et fonctionnalisées ou non).

L'exposition par voie respiratoire

Une des premières études sur la comparaison de particules fines (250 nm) et ultrafines (20 nm) de TiO₂ a été publiée par Oberdörster *et al.* (Oberdörster G., 1994). Dans cette étude par inhalation chez le rat, les auteurs ont observé une rétention pulmonaire plus importante des particules ultrafines trois mois après l'exposition. Les concentrations administrées étaient semblables pour les particules fines et ultrafines (respectivement 22,3 ± 4,2 et 23,5 ± 2,9 mg/m³). Les particules de 20 nm se retrouvaient dans les ganglions lymphatiques en plus grand nombre, phénomène indiquant la pénétration des espaces interstitiels. Le temps de clairance pulmonaire des particules ultrafines était allongé et la translocation de ces particules dans l'*interstitium* pulmonaire et aux nodules lymphatiques régionaux était significativement plus élevée pour les particules de 20 nm. La surface spécifique est le paramètre le mieux corrélé avec les effets observés.

Dans leur expérience par inhalation chez le rat, Oberdörster *et al.* et Ferin *et al.* (Ferin J., 1992) ont observé une augmentation significative de signes ou de paramètres de l'inflammation lors de l'administration de particules de TiO₂ de 20 nm, en comparaison avec la même masse de particules de 250 nm. Jusqu'à ces études réalisées par la même équipe, le dioxyde de titane était considéré comme une poussière non-toxique et servait de contrôle inerte dans plusieurs études toxicologiques. Des dommages à l'épithélium pulmonaire, l'obstruction des pores de Kohn, le développement de foyers de fibrose interstitielle et l'altération des fonctions des macrophages

⁴³ Coefficient qui représente l'aptitude d'un organe ou d'un tissu à éliminer d'un fluide de l'organisme une substance déterminée.

(médiateurs de l'inflammation) étaient significativement plus élevés. Ces résultats démontrent que des particules inertes peuvent devenir biologiquement actives lorsque la dimension est réduite à une taille nanométrique.

Warheit *et al.* ont étudié la toxicité aiguë de particules et de tiges de TiO₂ chez des rats. Des tiges d'anatase (200 nm x 35 nm ; surface de 26 m²/g) et des particules d'anatase (~ 10 nm ; surface de 169 m²/g) ont été administrées par instillation intratrachéale à des doses de 1 ou 5 mg/kg. Des particules de rutile (~ 300 nm ; surface de 6 m²/g) ont servi de contrôle négatif alors que le quartz a été utilisé comme contrôle positif. Les auteurs ont observé une inflammation transitoire et des dommages aux cellules 24 h après l'exposition aux tiges d'anatase et aux particules d'anatase. Les effets observés n'étaient pas différents des effets pulmonaires observés suite à l'exposition aux particules de TiO₂ de 300 nm, malgré des différences importantes de surface. L'exposition aux particules de quartz a provoqué une réponse inflammatoire dépendante de la dose caractérisée par une accumulation de neutrophiles et de macrophages de même qu'un épaissement du tissu pulmonaire indiquant le développement d'une fibrose pulmonaire. Les auteurs concluent que ces résultats sont en désaccord avec l'hypothèse voulant que la surface spécifique soit un facteur majeur associé à la toxicité des particules de dimensions nanométriques, mais ils soulignent que les causes à la base de cette divergence ne sont pas claires (Warheit D.B., 2006).

Chen *et al.* ont exposé des souris adultes mâles ICR à une dose unique (0,1 ou 0,5 mg) de TiO₂ (19 - 21 nm) par voie intratrachéale. Le TiO₂ induit de l'emphysème pulmonaire, l'accumulation de macrophages, de l'hyperplasie pneumocyte de type II et l'apoptose de cellules épithéliales. De plus, les auteurs ont noté une expression différenciée de centaines de gènes qui ont, entre autres, perturbé le cycle cellulaire, causé de l'apoptose, modifié le facteur de croissance du placenta et conduit à l'expression de certaines chimiokines pouvant causer de l'emphysème pulmonaire et l'apoptose de cellules épithéliales alvéolaires (Chen H.W., 2006).

Dans une autre étude, Warheit *et al.* concluent que les propriétés de surface sont critiques pour déterminer les effets des particules ultrafines de TiO₂. Par instillation intratrachéale à des doses de 1 à 5 mg/kg d'un échantillon de particules de rutile fin, d'un autre ultrafin, et d'un lot contenant 80 % d'anatase et 20 % de rutile avec un contrôle positif de quartz, ils ont exposé des rats (5 rats par groupe, par dose et par temps) et les ont évalués 24 heures, une semaine et trois mois après instillation. L'exposition au quartz, et à un moindre niveau au mélange anatase/rutile (uniquement pour les essais aux fortes concentrations pour le mélange) a produit de l'inflammation pulmonaire, de la cytotoxicité et des effets histopathologiques clairement distincts sur les tissus pulmonaires. En revanche, les particules fines et ultrafines de TiO₂ n'ont eu qu'un effet inflammatoire passager et ne représentent qu'un faible risque pulmonaire. Les auteurs concluent que les différences d'effets seraient dues à la structure cristalline, au pH des particules et à la réactivité chimique de surface, les particules d'anatase/rutile produisant plus de radicaux libres que celles de rutile, ce qui représenterait une des sources d'inflammation et de cytotoxicité. Les effets n'étaient pas totalement explicables uniquement par la surface des particules (Warheit D.B., 2007).

Grassian *et al.* ont exposé des souris en chambre d'inhalation de façon aiguë (4 h) et sub-aiguë (4 h / jour pendant 10 jours) à de l'anatase cristallin (TiO₂) agrégé (particules élémentaires de 2 à 5 nm; agrégats moyens de 123 nm) à des concentrations de 0,77 et 7,22 mg/m³. L'exposition aiguë a produit une toxicité pulmonaire ou de l'inflammation minimale alors que l'exposition sub-aiguë a conduit à une plus forte teneur en cellules totales et en macrophages dans le liquide broncho-alvéolaire. La réponse inflammatoire était modérée, significative mais réversible trois semaines après l'exposition (Grassian V.H., 2007).

Warheit *et al.* ont exposé des rats (5 rats par groupe, par dose et par temps) par instillation intratrachéale à des particules de quartz de 12, 50, 300 et 500 nm qui possédaient des surfaces

spécifiques de 4,2 à 90 m²/g et ont mesuré le potentiel hémolytique et l'activité de surface des particules. Après 24 h, une semaine, un mois et trois mois, ils ont évalué la prolifération cellulaire et ont fait une évaluation histopathologique du tissu pulmonaire. L'exposition aux différentes particules de quartz a produit une réponse inflammatoire soutenue et dépendante de la dose, l'accumulation de macrophages alvéolaires avec le développement précoce de fibrose pulmonaire et des effets cytotoxiques. Les effets observés ne sont pas toujours reliés à la surface de la particule mais sont bien corrélés à l'activité de surface hémolytique des différentes particules. Les résultats obtenus suggèrent que l'intensité des effets mesurés est mieux corrélée avec l'activité de surface hémolytique de test *in vitro* qu'avec l'aire de surface, la taille, la cristallinité, la teneur en métaux (fer) ou les radicaux de surface (Warheit D.B., 2007).

Reprotoxicité

Aucune donnée n'est actuellement disponible dans la littérature.

Cancérogénèse

Borm *et al.*, dans une revue sur le cancer pulmonaire, soulignent que les particules peu solubles, tels que le noir de carbone et le dioxyde de titane, sont reconnues pour causer des fibroses, des lésions néoplasiques et des tumeurs pulmonaires chez le rat. La quantité requise de ces produits pour générer les mêmes effets est beaucoup plus faible avec des nanoparticules (Borm P.J., 2004).

Génotoxicité et photogénotoxicité

Theogaraj *et al.* ont évalué la photo clastogénicité (test d'aberrations chromosomiques) de 8 types de particules de TiO₂ (14 nm à 60 nm ; concentration de 800 à 5 000 µg/ml) dans les cellules CHO en présence ou non d'UV (750 mJ/cm²) (Theogaraj E., 2007).

Tableau 6 : Description des 8 types de nanoparticules de TiO₂ testées par Theogaraj *et al.* (Theogaraj E., 2007) pour l'évaluation de la photo clastogénicité.

Sample Code	Crystal Type	Inorganic Coating	Organic Coating	Particle Size
A	Anatase (80%), rutile (20%)	None	Trimethoxy caprylylsilane	Approximately 21 nm ^a
B	Anatase (80%), rutile (20%)	None, doped di-iron trioxide (2 % ± 1%)	None	Approximately 21 nm ^a
C	Anatase (80%), rutile (20%)	None	None	Approximately 21 nm ^a
D	Rutile (100%)	Alumina (8% - 11%)	Simethicone (1% - 3%)	14 nm ^b
E	Anatase (100%)	Alumina (37%), silica (12% - 18%)	None	60 nm ^c
F	Rutile (100%)	Alumina (5% - 6.5%)	Dimethicone (1% - 4%)	20 nm ^b
G	Rutile (100%)	Alumina (3% - 8%)	Stearic acid (5% - 11%)	15 nm ^a
H	Rutile (100%)	Alumina (10.5% - 12.5%), silica (3.5% - 5%)	None	20 - 22 nm ^b

^a Primary particle size determined by transmission electron microscopy (TEM).

^b Primary particle size determined by X-ray diffraction.

^c Characterization by X-ray disc centrifugation (XDC) giving an aggregate rather than particle size.

L'essai a été réalisé en présence ou non d'activation métabolique S9. Aucune génotoxicité (en absence d'UV) ou photogénotoxicité (présence d'UV) des nanoparticules de TiO₂ n'a été montrée dans les conditions étudiées.

Linnainmaa *et al.* (Linnainmaa K., 1997) ont évalué la photo clastogénicité (test du micronoyau, cellules épithéliales hépatiques de rat) de 3 types de particules ultrafines de TiO₂ (UF1 : 20 nm, anatase, non enrobée, Degussa, P25 ; UF2 : 20 nm, rutile, enrobage d'hydroxyde d'aluminium et d'acide stéarique, UV-Titan M160 ; TiO₂ Pigmentaire : 170 nm, anatase, non enrobé, Kemira AFDC) aux doses de 5, 10 et 20 µg/cm² pendant 21 heures, en présence ou non d'UV. Aucune clastogénicité ou photogénotoxicité des particules ultrafines de TiO₂ n'a été montrée dans les conditions étudiées.

Nakagawa *et al.* (Nakagawa Y., 1997) ont évalué la photogénotoxicité de 4 types de particules de TiO₂ non enrobées 1) ultrafine, anatase, 21 nm ; 2) anatase, 255 nm ; 3) rutile, 255 nm; 4) rutile, 420 nm en utilisant les 4 tests de génotoxicité suivants :

- Salmonella typhimurium* / test d'Ames⁴⁴ avec microsomes;
- Cellules de lymphomes de souris L5178Y / essais de mutation sur des cellules de mammifère ;

⁴⁴ test de mutation génique *in vitro* sur bactéries,

- c. Cellules de lymphomes de souris L5178Y / test des comètes ;
- d. Cellules de hamster chinois CHL/IU / test des aberrations chromosomiques..

Les auteurs concluent que les particules photo excitées de TiO₂ sont génotoxiques *in vitro*. Elles induisent les lésions primaires à l'ADN ainsi que des aberrations chromosomiques mais pas de mutations géniques.

Les résultats des études de génotoxicité du TiO₂ rutile/anatase et anatase, du rapport *Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers Concerning Titanium Dioxide (2000)*⁴⁵ sont présentés dans les tableaux ci dessous.

Tableau 7 : Génotoxicité et photogénotoxicité *in vitro* de nanoparticules de TiO₂ enrobé (mélange Rutile/Anatase) PSMA 1.

	Rutile/Anatase	
	PSMA 1	
<i>Trade Name</i>	T805 DEGUSSA20/80 RU/AN	T817 DEGUSSA79/12/2 RU/AN/Fe
<i>Crystal size</i>	21	21
<i>Coating</i>	SILICON DIOXIDE <2.5 %	SILIC. DIOX. <2.5 % DIIRON TRIOX 2 %
<i>Photo-mut.</i>	BAC (neg.) CA (neg.)	BAC (neg.) CA (neg.)
<i>Mutagen.</i>	BAC (neg.) CA (neg.)	BAC (neg.) CA (neg.)
<i>Photo-tox.</i>	NRU (neg.)	NRU (neg.)

PSMA 1 to 6 : code names referring to the crystal types and to the various coatings
 BAC : bacterial assay
 CA : Chromosome aberration
 NRU : Neutral Red Uptake Photo-toxicity test

Source: *Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers Concerning Titanium Dioxide (2000)*, Table 1)

⁴⁵ http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out135_en.pdf

Tableau 8 : Génotoxicité et photogénotoxicité *in vitro* de particules de TiO₂ anatase PSMA 3.

	Anatase		
	PSMA 3		
<i>Trade Name</i>	MIRASUN TiW60 RHODIA	AFDC KEMIRA	MIRASUN TIWGO RHODIA
<i>Crystal size</i>	60	200 μ	60
<i>Coating</i>	ALUM. 3 – 7 % SILICA 12 – 18 %	/	/
<i>Photo-mut.</i>	BAC (neg.) CA (neg.)	BAC (neg.) CA (neg.)	BAC (neg.) CA (neg.)
<i>Mutagen.</i>	No data No data	No data No data	No data No data
<i>Photo-tox.</i>	No data	NRU (neg.)	No data

Source: *Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers Concerning Titanium Dioxide (2000)*, Table 2C).

Mécanismes d'action toxique

Renwick *et al.* ont exposé des macrophages alvéolaires (J774. 2 MΦ) à des particules fines et ultrafines de TiO₂ (250 et 29 nm) et de noir de carbone (260,3 et 14,3 nm) pendant 8 h. Aucune cytotoxicité significative n'a été observée, mais une diminution de la capacité de phagocytose des macrophages a été observée à une concentration de 0,39 μg / mm² pour les particules ultrafines de noir de carbone et 0,78 μg / mm² pour toutes les particules. À toutes les concentrations, les particules ultrafines de noir de carbone ont eu un effet plus marqué que les autres particules sur les macrophages. De façon générale, les effets sur la phagocytose se sont manifestés à une concentration inférieure pour les particules ultrafines (0,39 μg / mm² comparativement à 0,78 μg / mm² pour les particules fines). Les auteurs concluent que le ralentissement de la clairance des particules ultrafines dans les poumons est causé en partie par une diminution de la capacité de phagocytose des macrophages résultant de leur exposition à des particules (Renwick L.C., 2001).

Dans une expérience faite par instillation intratrachéale chez le rat, Hohn *et al.* ont mis en évidence une augmentation des neutrophiles pulmonaires, paramètres précoces de l'inflammation, pour des nanoparticules de TiO₂ de 20 - 30 nm. Cet effet n'était pas aussi significatif avec l'administration de particules de 180 nm. L'enrobage par méthylation, pour rendre les particules hydrophobes, donc encore moins solubles, a diminué légèrement la production de neutrophiles pour les 2 dimensions particulaires de TiO₂ lorsque les doses étaient de 1 mg, mais a eu peu d'impact aux doses de 6 mg. Les auteurs concluent que la surface des particules est le facteur déterminant dans l'inflammation pulmonaire, alors que l'enrobage par méthylation a eu un rôle marginal sur les paramètres de l'inflammation (Hohn D., 2002).

Gurr *et al.* ont étudié l'effet de particules ultrafines de TiO₂ sur des cellules épithéliales bronchiales humaines (BEAS-2B), en absence de photoactivation. Des particules d'anatase de 10 et 20 nm

(10 µg / ml) ont provoqué des dommages oxydatifs à l'ADN, une peroxydation des lipides, la formation de micronoyaux et une augmentation de la production de H₂O₂ et de NO dans les cellules. Des particules de 200 nm (ou plus) d'anatase n'ont pas induit de stress oxydatif en absence de lumière. Par contre, des particules de 200 nm de rutile ont induit une production de H₂O₂ et des dommages oxydatifs à l'ADN en l'absence de lumière. Enfin, le niveau de dommages oxydatifs à l'ADN des cellules a été légèrement plus élevé après une exposition à un mélange d'anatase et de rutile (200 nm ; 10 µg / ml pendant 1 h dans l'obscurité totale) comparativement à une exposition aux deux formes de TiO₂ séparément. Les auteurs concluent que plus la taille des particules est petite, plus leur potentiel pour induire un stress oxydatif est élevé (en absence de photactivation). Les particules ultrafines de TiO₂ sont habituellement considérées comme biocompatibles en absence de photoactivation (Gurr J.R., 2005).

Dans une autre étude, Barlow *et al.* ont exposé des cellules épithéliales alvéolaires de type II de rat (lignée L-2) à des nanoparticules de noir de carbone (14,3 nm ; 6 h). Les cellules épithéliales de type II joueraient un rôle important dans le processus inflammatoire dans les poumons par la production de cytokines proinflammatoires. Ces dernières sont responsables de la migration des leucocytes aux sites d'inflammation (par chimiotaxie). Les auteurs ont observé une production significative de chimioattractants par les cellules de type II, mesurée par la migration des macrophages. Des nanoparticules de TiO₂ (29 nm) et des particules fines de carbone et de TiO₂ (260,2 et 250 nm respectivement) n'ont pas eu cet effet. Une augmentation dépendante de la dose de la production de LDH suite à l'exposition aux quatre types de particules a également été observée. Les auteurs concluent que les nanoparticules de carbone sont fort probablement responsables de la production de chimioattractants par les cellules de type II (Barlow P.G., 2005).

Sayes *et al.* ont exposé des fibroblastes cutanés et des cellules épithéliales pulmonaires humaines à des nanoparticules sphériques d'anatase de 10 nm (une forme cristalline du TiO₂), des particules sphériques de rutile de 5,2 nm (une autre forme cristalline du TiO₂) et à des particules sphériques mixtes d'anatase/rutile de 3,2 nm avec des surfaces spécifiques de 112 (rutile) à 153 m² / g (anatase). De la cytotoxicité et de l'inflammation ont été observés à partir de concentrations de 100 µg / ml selon un comportement dose-réponse classique et les effets ont augmenté en fonction du temps et de la concentration. Les effets observés n'étaient pas corrélés à la surface des particules, l'anatase (surface spécifique 153 m² / g) étant 100 fois plus toxique que le rutile (surface spécifique 123 m² / g) à concentration égale. Les particules les plus cytotoxiques étaient les plus efficaces à générer des espèces réactives de l'oxygène et la toxicité augmentait rapidement avec une illumination dans l'ultraviolet, facteur favorisant la génération de radicaux libres (Sayes C.M., 2006).

Des cellules épithéliales pulmonaires humaines ont été exposées *in vitro* à des nanoparticules de silice contenant du fer, du cobalt, du manganèse et du titane de même qu'aux oxydes nanométriques de ces métaux. Les auteurs (Limbach L.K., 2007) ont utilisé des particules très bien caractérisées ayant les mêmes morphologies, de même que des dimensions, des formes et des degrés d'agglomération comparables. Ils ont démontré que ces particules pénètrent efficacement dans les cellules et provoquent jusqu'à huit fois plus de stress oxydatif dans le cas du cobalt et du manganèse que les solutions aqueuses des mêmes métaux. Ils concluent que l'évaluation du risque devrait également tenir compte des compositions chimiques et des propriétés catalytiques des nanoparticules.

Des chercheurs se sont intéressés à l'étude de phénomènes cellulaires se manifestant par l'induction de divers mécanismes ou par la production de médiateurs de l'inflammation.

Dans une expérience visant à évaluer la compatibilité sanguine de diverses formes du dioxyde de titane (TiO₂), Maitz *et al.* n'ont pas observé d'effet de la forme nanocristalline sur plusieurs

paramètres du plasma humain riche en plaquettes (agrégation plaquettaire et temps de coagulation) (Maitz M.F., 2003).

Une étude *in vitro* de Lucarelli *et al.* a démontré que les nanoparticules de SiO₂ et de cobalt (Co) présentaient une activité proinflammatoire significative sur l'activité des monocytes de la moelle humaine, alors que les nanoparticules de TiO₂ et de ZrO₂ présentaient une activité plus faible (Lucarelli M., 2004).

Peters *et al.*, étudiant le comportement et la viabilité de cellules endothéliales humaines *in vivo*, observaient que les nanoparticules de PVC, TiO₂, de SiO₂ et de Co étaient incorporées dans les vacuoles des cellules. Les nanoparticules de Co démontraient un potentiel proinflammatoire et cytotoxique important, alors que celles de SiO₂ avaient un potentiel proinflammatoire faible et celles de TiO₂ un potentiel encore moindre, mais observable, en dépit du fait que cette substance est souvent considérée comme biologiquement amorphe. Les nanoparticules de PVC et de Ni n'engendraient pas ces effets (Peters K., 2004).

L'exposition de microglies de souris *in vitro* à des nanoparticules de TiO₂ non photo-activées (2,5-120 ppm) a provoqué une production rapide (< 5 minutes) et prolongée (2 h) d'espèces réactives de l'oxygène de même que la phagocytose des nanoparticules par les microglies (Long T.C., 2006).

Conclusion

D'après les données publiées, les nanoparticules TiO₂ (forme anatase) sont absorbées au niveau pulmonaire et pourraient engendrer un phénomène inflammatoire. En relation avec leurs propriétés photocatalytiques, les nanoparticules de TiO₂ de forme anatase induisent également une cytotoxicité par un mécanisme principalement lié au stress oxydant. Les résultats de génotoxicité sont contradictoires et certains auteurs ont pu montrer des lésions primaires à l'ADN ainsi que des aberrations chromosomiques.

6.4.2.2 Danger pour l'environnement

6.4.2.2.1 *Données écotoxicologiques du dioxyde de titane*

Concentrations attendues dans l'environnement

Un travail sur un modèle d'exposition environnemental des nanoparticules manufacturées (Mueller N.C. et Nowack B., 2008), concernant en particulier les nanoparticules de titane a tenté d'évaluer des concentrations environnementales prédites (PEC) par rapport aux concentrations prédites sans effet (PNEC). Les auteurs avancent que les concentrations attendues sont de 0,7 à 16 µg / l et sont supérieures aux PNEC (< 0,1 µg / l). Les nanoparticules de TiO₂ ont le plus fort rapport PEC/PNEC comparées aux nanoparticules d'argent ou aux nanotubes de carbone.

Interaction avec le vivant

Des revues récentes (Hirano K., 2005 ; Hoffmann M., 2007; Ju-Nam Y. et Lead J.R., 2008) montrent que la production d'ERO par les nanoparticules de TiO₂, en présence de lumière, est la cause des dommages aux organismes aquatiques, qu'il s'agisse de micro-organismes (Oberdörster G., 2007) ou de poissons, avec pour ces derniers des problèmes inflammatoires et un stress respiratoire (Federici G., 2007; Reijnders L., 2008). Une des conséquences de la production d'ERO est le déclenchement de réactions en chaîne radicalaires destructrices, de type peroxydation lipidique, dans la couche de lipopolysaccharides bactériens par exemple.

Micro-organismes bactériens

La comparaison entre des oxydes de titane nanométriques et micrométriques montre des effets très faibles ou inexistantes sur des souches bactériennes variées comme des levures, *E Coli* ou des bacilles. Les raisons invoquées sont essentiellement le faible nombre de contacts avec la membrane cellulaire. Par contre, Sunada *et al.* ont notamment observé la destruction de la membrane externe puis interne chez *E. coli* en présence de nanoparticules de TiO₂ (Sunada K., 2003).

Algues

La toxicité de TiO₂ nanométrique et micrométrique vis-à-vis de différents types d'algues comme *Pseudokirchneriella subcapitata* a été étudiée suivant les tests de croissance normalisés par l'OCDE (OCDE 201) en présence et en l'absence de lumière. Les résultats obtenus sont peu différents. Le TiO₂ nanométrique est plus toxique que le micrométrique. La valeur de EC50 est de 35,9 mg / l pour le TiO₂ micrométrique et de 5,83 mg / l pour le nanométrique. En dessous de 0,98 mg / l le TiO₂ nanométrique ne montrait aucun effet alors que pour le TiO₂ micrométrique la dose est de 10,1 mg/l. Le TiO₂ nanométrique forme des agrégats en contact direct avec la surface des micro-algues. De même, des travaux sur des algues unicellulaires *Chlamydomonas reinhardtii* ont montré des réponses à des niveaux physiologiques, biochimiques et génomiques. La croissance était inhibée durant les deux ou trois premiers jours. Un stress oxydant apparaissait à partir de 6 heures de contact *via* des analyses de peroxydation des lipides. L'expression de quatre gènes marqueurs du stress (*sod1*, *gpx*, *cat*, and *ptox2*) apparaissait pour des concentrations en TiO₂ de 1 mg / l et à des temps de 1, 3, 5 et 6 h de contact et proportionnelles aux doses de TiO₂. La concentration finale de cellules était dépendante de la dose.

Poissons

Une étude très complète traite de l'exposition de la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à des nanoparticules de TiO₂ (Federici G., 2007). Des effets toxicologiques sont observés au niveau des branchies et se traduisent par la prolifération des cellules épithéliales et le développement d'œdèmes des filaments branchiaux. En revanche, les paramètres sanguins des poissons sont peu altérés. Une augmentation de l'activité de l'ATP-ase au Na⁺, K⁺ et une baisse de concentration des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) témoignent d'effets possibles sur l'osmorégulation et d'un stress oxydatif dans les branchies des poissons. Ces effets sont également observés dans l'intestin, et dans une moindre mesure dans le cerveau, mais pas dans le foie. D'après ces résultats, les deux voies d'exposition semblent donc entraîner une accumulation de nanoparticules, la voie directe étant cependant prépondérante par rapport à la voie trophique. Ces études ne donnent pas d'information sur la provenance des nanoparticules observées dans les organes internes des animaux. Ces dernières pourraient y être amenées par voie sanguine suite à un transfert à travers les cellules branchiales exposées par voie directe, ou suite à un passage à travers l'épithélium du tractus gastro-intestinal après exposition par voie trophique.

Invertébrés aquatiques

Trois études développées sur des espèces de crustacés : *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*) utilisant des nanoparticules et des microparticules de TiO₂ :

- ne montrent pas d'effets toxiques jusqu'à 20 g / l pour l'une (Heinlaan M., 2008) ;
- ne montrent pas d'effets cyto ou génotoxiques pour l'autre (Lee S.W., 2009) ;
- montrent des effets sur la reproduction sur 6 tests sur 25 (contact de 48 h) avec EC compris entre 0,5 mg / l et 91,2 mg / l. La mesure de la reproduction est plus sensible que la mortalité.

Après 21 jours de contact, le NOEC était de 30 mg / l pour la mortalité et de 3 mg / l pour la reproduction. Les valeurs de EC10 et EC50 pour la reproduction étaient respectivement de 5 et 26,6 mg / l.

Conclusion

Les travaux sur les effets du TiO₂ sur les écosystèmes sont peu nombreux par rapport à d'autres nanoparticules manufacturées. A ce jour, trois études sur des plantes (1) et sur des vers (2) ont été réalisées, conduisant à des effets positifs avec les plantes et nuls sur les vers. Les études sur des bactéries procaryotes montrent des effets contradictoires dus à des proptocipes différents. Rares sont les travaux complets intégrant la génotoxicité et la cytotoxicité. Un seul a été apparemment réalisé sur des poissons et montre une génotoxicité.

La dispersabilité de TiO₂ peut être aussi mise en cause. Les différentes formes de TiO₂ présentent toutes un point de charge nulle (PCN)⁴⁶ autour de pH 6 concourant à une forte agrégation. Cette agrégation peut limiter le contact avec les organismes comme les bactéries ou les micro-algues. Par contre cela n'affecte pas l'ingestion par les poissons, sauf si une sédimentation importante existe.

6.4.2.2 Evaluation du danger nano spécifique du produit fini

Ne disposant pas de données spécifiques au produit étudié, nous ne pouvons pas aujourd'hui conclure sur les dangers environnementaux associés à l'utilisation de ce produit.

Les quelques rares données sur le phénomène de lixiviation⁴⁷ de TiO₂ associé aux ciments donnent des quantités dans la phase aqueuse pouvant atteindre 600 µg / l. Par contre, on ne sait rien sur l'association des nanoparticules de TiO₂ avec les phases CSH (CaOSiO₂ x H₂O) qui représentent la phase minérale majeure des ciments hydratés.

6.4.3 Evaluation du risque

6.4.3.1 Discussion des résultats

Cette étude montre que, pour l'Homme, l'exposition par voie respiratoire n'a pu être estimée pour le produit B considéré. Cependant, elle ne peut pas être négligée.

Pour les effets spécifiques au produit B considéré (cf. chapitre incertitudes), l'absence de données n'a pas permis de conclure sur les dangers.

Cependant, l'absorption par voie pulmonaire est avérée et aux vues des données sur les nanoparticules de TiO₂ sous forme anatase, les effets constatés pour une exposition pulmonaire aiguë et chronique (effets inflammatoires, fibrose et emphysème pulmonaire), le danger pour l'homme ne peut pas être exclu.

Les données ne permettent pas de conclure sur les risques encourus par l'environnement. Etant donné les dangers observés pour le dioxyde de titane non spécifique du produit étudié et la dispersion environnementale avérée pour des produits équivalents, le risque ne peut pas être exclu pour l'environnement.

6.4.3.2 Discussion et identification des incertitudes

Scénario homme

La caractérisation du produit B n'est pas connue.

En l'absence d'études (éco) toxicologiques spécifiques au produit B, l'identification des dangers a été réalisée sur la base d'études génériques (nanoparticules de dioxyde de titane). Le danger supplémentaire que pourrait représenter l'absorption secondaire par voie orale des nanoparticules de TiO₂ n'a pas été pris en compte dans l'évaluation du produit B et pourrait donc modifier le niveau de risque potentiel lié à l'exposition à ce produit. En effet, dans le cas du dioxyde de titane

⁴⁶ valeur du pH pour laquelle la charge de surface est nulle.

⁴⁷ lessivage de produits solides par un solvant approprié, de façon à en extraire les parties solubles

et du ciment, nous avons pris en considération exclusivement la voie pulmonaire : voie directe d'exposition. Néanmoins, une exposition gastro-intestinale existe à un niveau significatif. En effet, les particules inhalées se déposent en partie dans la région trachéo-bronchique, mais la clairance mucociliaire et la déglutition conduisent à l'ingestion de ces particules. Concernant la toxicité du dioxyde de titane par voie orale, plusieurs études montrent des résultats contradictoires : Jani *et al.* n'observent pas de toxicité après une administration quotidienne pendant 10 jours de particules de TiO₂ de 500 nm (Jani P.U., 1994). Warheit *et al.* (Warheit D.B., 2007 a) montrent des résultats similaires avec une seule administration de nanoparticules de TiO₂ de 140 nm à des doses variant de 175 à 5 000 mg / kg pc. Au contraire, Wang *et al.* (Wang J.J., 2007) observent une toxicité hépatique, rénale et cardiaque avec des nanoparticules de TiO₂ mais les anomalies biologiques et histologiques varient avec la taille des nanoparticules (25, 80 et 155 nm).

Il est indispensable de fournir des études standards de toxicologie adaptées au TiO₂ sous forme anatase spécifique au produit B : entre autre des études de toxicologie chronique de génotoxicité, et reprotoxicité.

Des catégories de population, notamment celles souffrant de pathologies respiratoires (BPCO), pourraient être plus à risque et devraient faire l'objet d'une attention toute particulière lors d'une évaluation de risque sanitaire.

Scénario environnement

De manière identique à l'évaluation des risques pour l'homme, les études d'écotoxicologie adaptées au TiO₂ sous forme anatase spécifique au produit B considéré, indispensables à l'évaluation des risques pour l'environnement, sont manquantes.

6.4.3.3 Conclusion

Chez l'homme et pour l'environnement, pour les effets et le produit considérés dans les études et hors populations sensibles (*cf.* chapitre incertitudes), le risque, s'il ne peut pas être évalué, ne peut pas être exclu.

6.5 Crème solaire et dioxyde de titane

6.5.1 Evaluation de l'exposition

Les produits de protection solaire ont pour but d'éviter l'érythème de la peau en filtrant les rayonnements ultra-violet du soleil : les UV-B de longueurs d'onde comprises entre 290 et 320 nm et les UV-A de longueurs d'onde comprises entre 320 et 400 nm. Un grand nombre de composés organiques entrent dans leur formulation, dont des filtres optiques qui doivent à la fois stopper les rayonnements dangereux UV-A et UV-B tout en demeurant transparents pour des raisons d'esthétique. La réponse de l'œil humain se situant à des longueurs d'onde comprises entre 380 nm (violet) et 700 nm (rouge), les combinaisons de filtres utilisées dans les produits de protection solaire doivent donc atténuer avec une certaine efficacité (qui définit l'indice de protection) les rayonnements jusqu'à 400 nm, et par contre laisser passer le plus possible les rayonnements au-dessus de 380 - 400 nm.

Depuis déjà quelques années, certains fabricants utilisent des particules minérales de tailles nanométriques d'oxyde de titane (TiO₂) et/ou d'oxyde de zinc (ZnO) dans les crèmes solaires, afin d'en augmenter l'indice de protection. Ces nanoparticules semi-conductrices atténuent les rayonnements UV par une combinaison d'absorption (de la même façon que les cellules photovoltaïques), de déflexion et de diffusion de la lumière.

La taille nanométrique (< 30 nm) est indispensable pour que la crème reste transparente (éviter les phénomènes de diffusion dans le domaine du visible) et pour le cas du TiO₂, présenter une meilleure efficacité d'absorption des rayonnements UV.

Les nanoparticules primaires utilisées, cristallites de tailles typiquement comprises entre 10 et 30 nm, s'agglomèrent entre elles pour former des nanoparticules généralement de plusieurs microns, tout en conservant leurs propriétés optiques.

La présence de nanoparticules dans les produits solaires favorise également leur adhérence sur la peau.

Les nanoparticules de TiO_2 sont insolubles, elles peuvent exister dans 2 phases cristallographiques principales : anatase et rutile. Pour les produits de protection solaire, les fabricants utilisent généralement la phase rutile, qui présente moins d'effet parasite photocatalytique : génération d'espèces oxydantes en présence d'oxygène dissout. Les nanoparticules de TiO_2 sont le plus souvent enrobées dans une coquille de silice, d'alumine *etc.* pour inhiber cet effet, puis fonctionnalisées chimiquement par le greffage de molécules organiques assurant la stabilité de leur dispersion dans les formulations.

6.5.1.1 Caractéristiques du produit solaire étudié

Le produit C étudié est une crème solaire pour le corps à appliquer manuellement, d'indice de protection SPF 30, vendue pour empêcher les coups de soleil et le vieillissement de la peau, de consommation courante, disponible sur le marché français et représentatif sur le plan technologique des crèmes solaires de dernière génération comportant des particules nanostructurées, d'après le producteur C1.

Comme beaucoup de produits du marché, sa formulation est complexe, elle comprend comme absorbeurs optiques des rayonnements UV-B et UV-A des nanoparticules d'oxyde de titane TiO_2 (pas de ZnO) et un absorbeur organique. Le fabricant de la crème solaire ajoute directement dans sa formulation des nanoparticules de TiO_2 , disponibles sur le marché, sans modification.

Le Tableau 9 décrit les caractéristiques des nanoparticules industrielles présentes dans des crèmes solaires dont celle étudiée.

Le producteur C1 achète à un fournisseur les nanoparticules de dioxyde de titane prêtes à l'emploi : elles sont enrobées d'hydroxyde d'aluminium pour limiter les effets photocatalytiques et fonctionnalisées par de l'acide stéarique pour les disperser dans la crème.

D'après les données communiquées au groupe de travail par le producteur C1 (audition du 21 septembre 2009), la stabilité de la dispersion a été vérifiée entre 20 et 45°C par le fabricant de la crème solaire. Elle est supérieure à 36 mois. Nous ne disposons pas de données sur la stabilité dans les milieux aquatiques des nanoparticules utilisées.

Tableau 9 : Caractéristiques des nanoparticules industrielles présentes dans la crème solaire étudiée (d'après www.tayca.co.jp)

Type de nanoparticules	Oxyde de titane (TiO ₂) enrobé et fonctionnalisé
Masse du produit industriel dans la crème solaire	10%
Phase cristalline	100% rutile
Taille des cristallites primaires	18 nm (distribution à 50% : 9 - 24 nm)
Agrégats	Bâtonnets de 70 à 150 nm d'après photo TEM
Enrobage	Hydroxyde d'aluminium (Al(OH) ₃)
Fonctionnalisation	Acide stéarique (CH ₃ -[CH ₂] ₁₆ -COOH)
Composition massique du produit industriel :	
TiO₂	83%
Al(OH)₃	9%
CH₃-[CH₂]₁₆-COOH	8%
Porosité	Inconnue
Potentiel Zeta	Inconnu

6.5.1.2 Définition du scénario d'exposition pour l'homme

Dans le cas de l'utilisation d'une crème solaire à application manuelle, la voie d'exposition principale est la voie cutanée. Le groupe de travail pose l'hypothèse que l'intégralité des nanoparticules contenues dans la crème solaire appliquée est en contact avec la peau. En d'autres termes, la disponibilité des nanoparticules contenues dans la crème solaire appliquée sur la peau est considérée à 100 % pour l'exposition cutanée.

Le risque d'aérosolisation de nanoparticules contenues dans un liquide est considéré comme négligeable. Au vue de la méthodologie adoptée dans le cadre de ce rapport, la voie d'exposition pulmonaire (aérosolisation de nanoparticules contenues dans un liquide) et la voie orale (voie d'exposition accidentelle chez les enfants) ne sont donc pas étudiées.

De même, la co-exposition avec d'autres substances éventuellement présentes sur la peau ne sera pas étudiée.

Durée et fréquence d'utilisation :

Concernant les statistiques d'utilisation des crèmes solaires, nous reprenons la méthode utilisée dans le rapport du RIVM de 2006 (Institut National Hollandais de santé public et de l'Environnement) qui se base sur le guide technique Européen (1996) rédigé en support de la directive 93/67/EEC concernant les substances récemment notifiées et la commission des lois 1488/94 concernant les substances existantes :

- été : 2 à 3 enductions par jour sur tout le corps sur une période cumulée de 2 semaines ;
- hiver : 2 à 3 enductions par jour sur le visage uniquement sur une période cumulée d'une semaine.

Population exposée :

La population susceptible d'être exposée est la population générale (dont les populations sensibles).

Surface d'exposition :

La surface du corps humain d'après l'ouvrage *Body Surface Area* (Bender A.E. et Bender D.A., 1995) est en moyenne (homme / femme) de 17 000 cm² et celle du visage de 112,5 cm² d'après l'agence de protection environnementale américaine (US EPA,2000).

Quantité utilisée :

D'après le fabricant de la crème solaire étudiée, la concentration moyenne surfacique de crème enduite doit être comprise entre 1 et 2 mg par cm² de peau pour assurer les performances annoncées. Le calcul conduirait donc à une utilisation d'environ 100 g de crème solaire par jour. Ce chiffre n'est évidemment pas réaliste, car dans la pratique on ne s'enduit pas de crème sur tout le corps et surtout on utilise des concentrations surfaciques beaucoup plus faibles que celles correspondant à l'indice de protection annoncé.

Pour la quantité journalière, on se référera finalement à l'estimation donnée par le *Scientific Committee on Consumer Products (SCCP)*⁴⁸ révision 6 p.89 : « une valeur d'utilisation réaliste de crème solaire serait de l'ordre de 18 g / jour ».

Calcul de dose :

La prise en compte de la concentration de TiO₂ dans la crème solaire choisie pour cette évaluation permet de calculer l'exposition quotidienne maximale en nanoparticules de TiO₂ enrobées et fonctionnalisées qui est donc de 18 g x 10 % = 1,8 g / jour ou environ 38 g / an pour une utilisation de 3 semaines.

6.5.1.3 Définition du scénario de dispersion environnementale**Évaluation de la quantité de nanoparticules de TiO₂ disséminée annuellement dans l'environnement en France par les produits solaires**

D'après *Eurostaf* (société du groupe *Les Echos*), spécialisé dans les expertises sectorielles de marché, le chiffre d'affaire annuel des produits solaires était déjà estimé à plus de 400 millions d'euros TTC en 2006 (*Eurostaf*,2007). Une analyse sommaire des prix des produits du marché en vente dans l'hexagone, en considérant les 15 premiers produits comparés sur le site *Leguide.com*, donne une idée du prix de vente TTC moyen des crèmes solaires de 171 € / kg.

Suivant l'estimation ci-dessus, l'achat de crèmes solaires en France correspondrait alors à 2 300 tonnes.

Afin de rendre compte de la dispersion environnementale des substances étudiées, nous considérerons simplement que toute masse de produit utilisée sera tôt ou tard rejetée dans l'environnement (effluents liquides, sols, atmosphère).

⁴⁸ http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/04_sccp_en.htm

Il est très difficile de connaître la part des produits solaires contenant du nano TiO₂ et la concentration moyenne en TiO₂ de ces produits. On ne peut donc qu'estimer un majorant pour la quantité de TiO₂ disséminée annuellement en France dans l'environnement, en considérant que toutes les crèmes solaires contiennent 10 % de TiO₂ : soit 230 tonnes / an.

Les dispersions de nanoparticules sont stables dans la crème. La dilution dans le milieu naturel peut favoriser l'agglomération des nanoparticules entre elles ou avec d'autres matières en suspension du milieu. La fonctionnalisation des nanoparticules peut se dégrader au cours du temps dans les milieux naturels. Par contre, le TiO₂ est très stable chimiquement à long terme, compte tenu de sa faible solubilité.

6.5.2 Evaluation du danger

6.5.2.1 Danger pour l'homme

6.5.2.1.1 *Profil toxicologique général du nanomatériau*

Cf. chapitre 6.4.2.1.1.

6.5.2.1.2 *Evaluation du danger nano spécifique du produit fini*

La recherche bibliographique a été réalisée en retenant les essais menés par voie cutanée qui correspond à la voie d'absorption majoritaire retenue chez l'homme pour le produit C, et avec l'utilisation de nanoparticules TiO₂ rutile (enrobées et fonctionnalisées ou non).

Toxicité chronique par voie cutanée :

Un seul essai de toxicité chronique par voie cutanée est disponible. Le traitement par particules de TiO₂ pendant 4 semaines n'a entraîné aucune apparition d'érythème ou d'œdème au niveau de la peau d'oreille des porcs traités (Wu J., 2009). Aucun signe clinique anormal ou de changements comportementaux des animaux des groupes témoin et traités n'a été observé. En revanche, une pénétration à travers la couche cornée a été retrouvée comme cela est décrit dans le paragraphe suivant.

Pénétration et absorption du TiO₂ :

Si de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, utilisant différents modèles de peau, montrent que les nanoparticules de TiO₂ ne pénètrent pas les tissus cutanés vivants et restent limités aux premières couches du *Stratum corneum*, d'autres démontrent que les nanoparticules de TiO₂ peuvent pénétrer à travers la peau au-delà du *Stratum corneum* et atteindre des cellules vivantes.

Lademann *et al.* n'ont pas observé d'absorption significative de nanocristaux de TiO₂ enrobés (17 nm) (UV-Titan M 160, L'Oréal, TiO₂ 80 % / Al₂O₃ 7 % / acide stéarique 10 %), au-delà de la couche cornée de la peau de volontaires humains, à l'exception d'une faible quantité (< 1 %) qui avait pénétré les follicules pileux. Puisque les follicules sont aussi isolés des tissus vivants par une couche cornée, les auteurs concluent à l'absence d'absorption cutanée du TiO₂ dans les tissus cutanés vivants (Lademann J., 1999).

Schulz *et al.* et Pflucker *et al.* n'ont pas observé d'absorption cutanée du TiO₂ nanocristallin dans les couches inférieures à la couche cornée de la peau chez l'humain, après avoir testé l'application de trois formulations dont les caractéristiques particulières différaient (T805 : 20 nm surface hydrophobe Ti/Si, cubique ; Eusolex T-2000 : 10 - 15 nm cubique, s'agglomérant en 100 nm, surface amphiphile Ti/Al/SiO₂, en forme d'aiguilles ; Tioveil AQ-10P : 100 nm, surface hydrophile Ti/Al/Si, en forme d'aiguilles). Les auteurs montrent une localisation du TiO₂ exclusivement au

niveau des couches supérieures du *Stratum corneum* et concluent à l'absence d'absorption cutanée du TiO₂ dans les tissus cutanés vivants (Pflucker F., 2001; Schulz J., 2002).

Les crèmes solaires sont utilisées sur peau saine mais peuvent l'être également sur peau lésée. Dans la population générale, 30 à 50 % des individus sont atopiques (prédisposition aux allergies) et 2 à 3 % souffrent de psoriasis (SSCP, 2007). Au niveau de la peau psoriasique, le *Stratum corneum* est plus épais (jusqu'à 100 µm), comparé à la peau saine (10 à 15 µm) et la fonction de barrière de la peau peut en être altérée.

Dans le cadre du projet Nanoderm, Pinheiro *et al.* (Pinheiro T., 2007) ont étudié la pénétration des nanoparticules de TiO₂ (crèmes solaires commerciales) sur peau saine ou peau psoriasique. La pénétration des nanoparticules de TiO₂ est plus profonde au niveau du *Stratum corneum* de la peau lésée comparée à la peau saine. Cependant, aucune pénétration de TiO₂ n'est retrouvée au niveau des cellules vivantes de la *Granulosa* ou du *Spinosa strata*.

D'autres articles ou revues montrent une pénétration jusqu'à l'épiderme des nanoparticules de TiO₂.

Par exemple, Menzel *et al.* (Menzel F., 2004) ont réalisé une étude sur des coupes de peau de porc traitées avec quatre différentes formulations contenant des particules de TiO₂ micronisé d'environ 15 nm de diamètre. En raison de la taille des nanoparticules, il a été supposé que les particules de TiO₂ peuvent passer à travers la couche superficielle cornée de la peau (*Stratum corneum*) via des canaux intercellulaires et pénétrer ainsi dans les couches profondes de la peau (cellules viables). Les formulations ont été appliquées sous forme de pansement (1 cm²) et les échantillons ont été prélevés 8, 24 et 48 h après l'application. Les mesures ont été effectuées sur les biopsies de la peau. L'analyse s'est concentrée sur la profondeur et sur les voies de pénétration des particules de TiO₂ dans la peau. Au cours des mesures, la pénétration de particules de TiO₂ à travers le *Stratum corneum* dans le *Stratum granulosum* via l'espace intercellulaire a été mise en évidence. En revanche, les follicules pileux ne semblent pas être des voies de pénétration importantes, le TiO₂ n'ayant pas été détecté à l'intérieur. La concentration de particules de TiO₂ dans le *Stratum spinosum* s'est révélée inférieure au seuil minimal de détection d'environ 1 particule / m².

Récemment, Wu *et al.* (Wu J., 2009) ont montré que, après l'application topique sur l'oreille de porc pendant 30 jours consécutifs avec environ 24 mg de la formulation à tester contenant 5 % de TiO₂, des nanoparticules de TiO₂ (4 nm et 60 nm) pouvaient pénétrer à travers la couche cornée et se retrouver dans la couche profonde de l'épiderme. En effet, des nanoparticules de TiO₂ ont été détectées dans le *Stratum corneum*, le *Stratum granulosum* et au niveau de la couche basale, mais pas dans le derme. La capacité des nanoparticules de TiO₂ à pénétrer à travers la peau est dépendante de leur taille, car seules les nanoparticules de TiO₂ de 4 nm ont atteint la couche la plus profonde de l'épiderme (couche basale).

Par ailleurs, des biopsies (2 mm de diamètre) effectuées au niveau de l'oreille des porcs ont été prélevées 24 heures après le dernier traitement. L'analyse par microscopie électronique en transmission (MET) de l'épiderme pénétré par des nanoparticules de TiO₂ a révélé des modifications des structures cellulaires telles qu'un allongement de l'espace intercellulaire, une détérioration des desmosomes et la présence de vacuoles autour du noyau des cellules basales.

D'après les auteurs, ces résultats indiquent que l'application topique de nanoparticules de TiO₂ pour une période prolongée peut induire une toxicité cutanée, probablement associée avec la génération de radicaux libres, du stress oxydant et un appauvrissement en collagène qui peuvent entraîner un vieillissement de la peau.

Par ailleurs, après 60 jours d'exposition par voie cutanée chez des souris *nude*, les nanoparticules de TiO₂ peuvent pénétrer à travers la peau, atteindre différents tissus et induire diverses lésions pathologiques au niveau de plusieurs organes majeurs. Les résultats indiquent qu'après une

exposition subchronique par voie cutanée, les nano particules de TiO_2 s'accumulent principalement dans la rate, le cœur et le foie, mais, à l'exception de l'une d'entre elles (P25 Degussa : environ 21 nm, surface spécifique de $50 \text{ m}^2/\text{g}$, 25 % rutile / 75 % anatase), elles ne peuvent pas passer la barrière hémato-encéphalique.

Enfin, comme le souligne le rapport Nanoderm⁴⁹ (2007), il subsiste également encore quelques questions ouvertes concernant par exemple la peau brûlée par le soleil ou la peau atopique. En outre, le rôle des microlésions n'est pas clair. La plus grande incertitude est liée au fait que des publications ont démontré que la flexion mécanique de la peau peut largement augmenter la pénétration (Rouse J.G., 2007; Tinkle S.S., 2003). D'une façon générale, l'exposition cutanée aux nanoparticules peut se produire lors de l'utilisation de cosmétiques et dans l'application intentionnelle de crèmes topiques (et autres traitements médicamenteux).

Les premières études de l'absorption de nanoparticules à travers la peau ne sont pas concluantes, d'autres montrent la pénétration dans l'épiderme, tandis que d'autres en utilisant des protocoles plus complexes montrent une absorption plus profonde dans l'épiderme (Vega-Villa K.R., 2008).

Génotoxicité et photogénotoxicité

Theogaraj *et al.* (Theogaraj E., 2007) ont évalué la photo-clastogénicité (test d'aberrations chromosomiques) de 8 types de particules de TiO_2 (14 nm à 60 nm ; concentration de 800 à 5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dans les cellules CHO en présence ou non d'UV (750 mJ/cm^2).

L'essai a été réalisé en présence ou non d'activation métabolique S9. Aucune génotoxicité (en absence d'UV) ou photogénotoxicité (présence d'UV) des nanoparticules de TiO_2 n'a été montrée dans les conditions étudiées.

Cette étude aussi intéressante soit-elle ne résout pas définitivement la polémique concernant la génotoxicité et la photogénotoxicité des nanoparticules de TiO_2 .

Linnainmaa *et al.* ont évalué la photo clastogénicité (test du micronoyau, cellules épithéliales hépatiques de rat) de 3 types de particules ultrafines de TiO_2 (UF1 : 20 nm, anatase, sans enrobage, Degussa, P25 ; UF2 : 20 nm, rutile, enrobé avec hydroxyde d'aluminium et acide stéarique, UV-Titan M160 ; TiO_2 pigmentaire : 170 nm, anatase, sans enrobage, Kemira AFDC) aux doses de 5, 10 et 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pendant 21 heures, en présence ou non d'UV. Aucune clastogénicité ou photogénotoxicité des particules ultrafines de TiO_2 n'a été montrée dans les conditions étudiées (Linnainmaa K., 1997).

Les résultats des études de génotoxicité du TiO_2 rutile/anatase et rutile, du rapport « *Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers Concerning Titanium Dioxide (2000)* » sont présentés dans les tableaux ci dessous.

⁴⁹ <http://www.uni-leipzig.de/~nanoderm/index.html>

Tableau 10 : Description des 8 types de nanoparticules de TiO₂ testées par Theogaraj *et al.* (2007) pour l'évaluation de la photo-clastogénicité.

Sample Code	Crystal Type	Inorganic Coating	Organic Coating	Particle Size
A	Anatase (80%), rutile (20%)	None	Trimethoxy caprylylsilane	Approximately 21 nm ^a
B	Anatase (80%), rutile (20%)	None, doped di-iron trioxide (2 % ± 1%)	None	Approximately 21 nm ^a
C	Anatase (80%), rutile (20%)	None	None	Approximately 21 nm ^a
D	Rutile (100%)	Alumina (8% - 11%)	Simethicone (1% - 3%)	14 nm ^b
E	Anatase (100%)	Alumina (37%), silica (12% - 18%)	None	60 nm ^c
F	Rutile (100%)	Alumina (5% - 6.5%)	Dimethicone (1% - 4%)	20 nm ^b
G	Rutile (100%)	Alumina (3% - 8%)	Stearic acid (5% - 11%)	15 nm ^a
H	Rutile (100%)	Alumina (10.5% - 12.5%), silica (3.5% - 5%)	None	20 - 22 nm ^b

^a Primary particle size determined by transmission electron microscopy (TEM).

^b Primary particle size determined by X-ray diffraction.

^c Characterization by X-ray disc centrifugation (XDC) giving an aggregate rather than particle size.

Tableau 11 : Résultats des essais *in vitro* de génotoxicité de PSMA1 : nanoparticules TiO₂ (rutile/anatase enrobées)

	Rutile/Anatase	
	PSMA 1	
Trade Name	T805 DEGUSSA20/80 RU/AN	T817 DEGUSSA79/12/2 RU/AN/Fe
Crystal size	21	21
Coating	SILICON DIOXIDE <2.5 %	SILIC. DIOX. <2.5 % DIIRON TRIOX 2 %
Photo-mut.	BAC (neg.) CA (neg.)	BAC (neg.) CA (neg.)
Mutagen.	BAC (neg.) CA (neg.)	BAC (neg.) CA (neg.)
Photo-tox.	NRU (neg.)	NRU (neg.)

PSMA 1 to 6 : code names referring to the crystal types and to the various coatings

BAC : bacterial assay

CA : Chromosome aberration

NRU : Neutral Red Uptake Photo-toxicity test

Source : Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers Concerning Titanium Dioxide (2000), Table 1.

Tableau 12 : Résultats des essais *in vitro* de génotoxicité de PSMA2, PSMA 4, PSMA 5 et PSMA 6 : nanoparticules TiO₂ (rutile enrobées ou non).

	Rutile									
	PSMA 2		PSMA 4		PSMA 5					
	UV-TITAN M262 KEMIRA	UV-TITAN M160 KEMIRA	UV-TITAN M212 KEMIRA	UV-TITAN M160 KEMIRA	UV-TITAN X161 KEMIRA	MT-100TV MITS/TAY	MT-100Z MITS/TA	MT-100T-L-1 MITS/TA	SOLAVEIL FINE PART. POWDER UNIGEMA	
<i>Trade Name</i>	EUSOLEX 2000 MERCK									
<i>Crystal size</i>	14	20	20	17/20	15	15	15	15	10-28	
<i>Coating</i>	ALUM. 8-11 % SOMETHI CONE 1-3 %	ALUM. 5-6.5 % DIME- THICONE 1-4 %	ALUM. 5-6.5 % GLYC. 1 %	ALUM. 5.5-7.5 % STEAR. ACID. 10 %	ALUM. 8.5-11.5 % STEAR. ACID. 10 %	ALUM. 1-15 % ALL. STEAR. ACID. 1-13 %	ALUM. 6-10 % STEAR. ACID. 10-16 %	ALUM. 3.3-7.3 % STEAR. ACID. 5-11 %	ALUM. 5-15 % ALL. STEAR. 5-15 %	
<i>Photo-mut.</i>	BAC (neg.) CA (neg.)	BAC (neg.) CA (neg.)	BAC (neg.) No data	BAC (neg.) No data	No data No data	BAC (neg.) CA (neg.)	No data No data	No data No data	No data No data	No data
<i>Mutagen.</i>	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data	No data
<i>Photo-tox.</i>	No data	No data	No data	No data	No data	NRU (neg.)	No data	No data	No data	No data

Source: Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers Concerning Titanium Dioxide (2000), Table 2A and Table 2B.

Tableau 13 : Résultats des essais *in vitro* de géotoxicité de PSMA2, PSMA 4, PSMA 5 et PSMA 6 : nanoparticules TiO2 (rutile enrobées ou non) (suite)

	Rutile									
	PSMA 5		PSMA 6							
	MT-100TV MITS. TAYCA	UV-TITAN x-200 KEMIRA	SOLAVEIL FINE PART. POWDER UNIGEMA	MT-100SA MITS/TA	MT-500SA MITS/TA	MT-100AQ MITS/TA	TTO 51C MERCK	TTO 51A MERCK		
<i>Crystal size</i>	15	20	11-28	15	35	15	35	35	35	
<i>Coating</i>	/	/	ALUM. 10.5-12.5% SILICA 3.5-5.5%	ALUM. 4-7.5% SILICA 2-4%	ALUM. 1-2.5% SILICA 4-7%	ALUM. 4-8% SILICA 7-11%	ALUM. 11% SILICA 1-7% ST.AC. 3-7%	ALUM. 11% SILICA 17%		
<i>Photo-mut.</i>	BAC (neg.) CA (neg.)	BAC (neg.) CA (neg.)	No data CA (neg.)	No data No data	No data No data	No data No data	BAC (neg.) No data	BAC (neg.) No data		
<i>Mutagen.</i>	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data	No data No data		
<i>Photo-tox.</i>	NRU (neg.)	NRU (neg.)	No data	No data	No data	No data	No data	No data		

Source: Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers Concerning Titanium Dioxide (2000), Table 2A and Table 2B.

Les effets cellulaires

Les filtres solaires ont retenu l'attention des chercheurs au cours des dernières années, en particulier à cause du potentiel de certaines de leurs composantes à générer la production de radicaux libres et de modifications de l'ADN des cellules – donc potentiellement à induire des effets cancérigènes. Cela serait principalement lié à leur photo instabilité.

Sayes *et al.* ont exposé des fibroblastes cutanés et des cellules épithéliales pulmonaires humaines à des nanoparticules sphériques d'anatase de 10 nm (une forme cristalline du TiO₂), des particules sphériques de rutile de 5,2 nm et à des particules sphériques mixtes d'anatase/rutile de 3,2 nm avec des surfaces spécifiques de 112 (rutile) à 153 m²/g (anatase). De la cytotoxicité et de l'inflammation ont été observés à partir de concentrations de 100 µg / ml selon un comportement dose-réponse classique et les effets ont augmenté en fonction du temps et de la concentration. Les effets observés n'étaient pas corrélés à la surface des particules, l'anatase (surface spécifique 153 m²/g) étant plus toxique que le rutile (surface spécifique 123 m²/g) à concentration égale. Les particules les plus cytotoxiques étaient les plus efficaces à générer des espèces réactives de l'oxygène et la toxicité augmentait rapidement avec une illumination dans l'ultraviolet, facteur favorisant la génération de radicaux libres (Sayes C.M., 2006).

6.5.2.2 Danger pour l'environnement

6.5.2.2.1 *Données écotoxicologiques du nanomatériau étudié*

Cf. chapitre 6.4.2.1.1

6.5.2.2.2 *Evaluation du danger nano spécifique du produit fini*

Très peu de travaux sont publiés sur les risques pour les écosystèmes liés au relargage des nanoparticules de TiO₂ issues de l'emploi des cosmétiques (crèmes solaires).

Les travaux sur les propriétés photocatalytiques des oxydes de titane (rutile et anatase) existent bien entendu. Ils sont utilisés industriellement pour ces raisons, en particulier pour le traitement de certains effluents aqueux (photo-oxydation de molécules organiques), ou pour la photo-oxydation de molécules gazeuses.

Des travaux s'intéressant aux impacts sur les écosystèmes existent. Ils concernent presque exclusivement des nanoparticules de TiO₂ synthétisées en laboratoire.

Actuellement deux articles récents traitent i) de la production de radicaux libres de l'oxygène par des formulations industrielles, ii) des effets chroniques et aigus du TiO₂ (Ti-Lite) sur *Daphnia magna*.

Le premier article (Brezova V., 2005) est une étude par résonance paramagnétique électronique de crèmes solaires qui a comparé 9 crèmes contenant du nano TiO₂ en fonction de différents filtres organiques, la production d'espèces réactives de l'oxygène produits par irradiation de la crème ou des émulsions. Les résultats montrent que si le nano TiO₂ n'est pas correctement désactivé, la production d'ERO est de 0,625 à 3,75 mg / ml pour une quantité de TiO₂ de 0,1 à 0,4 % en masse.

Le deuxième article de K. Wiench *et al.* concerne les effets du Ti-Lite formulé en surface par des hydroxydes d'aluminium et/ou oxydes de silice, ainsi que des organo-silicium ou silanes. Les tests sur les daphnies furent développés selon la norme OCDE. Des analyses granulométriques et de sédimentation ont été faites, montrant une agrégation importante avec des D90 % pouvant atteindre environ 300 µm⁵⁰. Les auteurs montrent une faible toxicité aiguë, la mortalité ne semblant pas être un indicateur pertinent. Les tests de

⁵⁰ Autrement dit, les tests de granulométrie indiquent que 90 % des particules présentes ont des diamètres apparents supérieurs à 300 µm

reproduction montrent une toxicité chronique à des concentrations 1 à 10 fois moindre que pour les tests de toxicité aiguë (Wiench K., 2009).

Aucune analyse de l'altération des particules de T-Lite n'a été faite, ni de production d'ERO.

6.5.3 Évaluation du risque

6.5.3.1 Discussion des résultats

L'étude de cas réalisée montre que, pour l'homme, l'exposition cutanée au produit considéré est avérée. Néanmoins, la plupart des publications montrent qu'il n'y a pas d'absorption (pas de passage vers la voie systémique). La présence de nanoparticule de TiO₂ se limite au *Stratum corneum* (couche superficielle de l'épiderme) pour une peau saine dans les modèles de peau humaine. Cependant, quelques études récentes ont montré que les nanoparticules de TiO₂ pouvaient passer jusqu'à l'épiderme.

L'enrobage des nanoparticules et l'utilisation de la seule espèce rutilé inhibe les effets photocatalytiques (production d'ERO). Aucun effet toxique lié à une exposition par voie cutanée n'a été identifié parmi les effets toxiques recherchés et les temps d'exposition considérés. En particulier, les études de reprotoxicité, de toxicité chronique et des études standards de génotoxicité font défaut.

Pour les effets et le produit considérés dans les études et hors populations sensibles (*cf.* chapitre incertitudes), le risque ne peut donc pas être exclu.

Les données disponibles ne permettent pas de conclure sur les risques encourus par l'environnement.

6.5.3.2 Discussion et identification des incertitudes

Scénario homme :

En l'absence d'études toxicologiques spécifiques au produit C, l'identification des dangers a été réalisée sur la base de quelques études génériques (nanoparticules de dioxyde de titane forme rutilé, mélange rutilé/anatase, nanoparticules enrobées ou non, *etc.*).

Si certaines études *in vitro* et *in vivo*, utilisant différents modèles de peau, montrent que les nanoparticules de TiO₂ ne pénètrent pas les tissus cutanés vivants et restent limitées aux premières couches du *Stratum corneum*, à l'inverse, d'autres semblent indiquer que le passage cutané existe et que les nanoparticules de TiO₂ peuvent se retrouver dans la couche profonde de l'épiderme.

Il est indispensable de fournir des études toxicologiques adaptées : études de reprotoxicité, de toxicité chronique et des études standards de génotoxicité.

Des catégories de population (peau lésées, études sur psoriasis, enfants, femmes enceintes) pourraient être plus à risque et devraient faire l'objet d'une attention particulière lors d'une évaluation de risque sanitaire.

Scénario environnement :

La stabilité de l'enrobage des nanoparticules de dioxyde de titane contenues dans le produit C, dans les différents compartiments environnementaux ainsi que le potentiel d'agrégation dans les milieux ne sont pas connus.

Il n'existe que deux études sur le produit C étudié. En l'absence de données spécifiques, les quantités relarguées associées au produit ont dû être estimées.

6.5.3.3 Conclusion

Concernant le produit C étudié :

Chez l'homme, pour les effets et le produit considérés dans les études, étant donné les incertitudes sur le potentiel de pénétration cutanée et sur l'activité phototoxique, les risques ne peuvent pas être exclus.

Pour l'environnement, le risque ne peut être estimé, il ne peut donc pas être exclu.

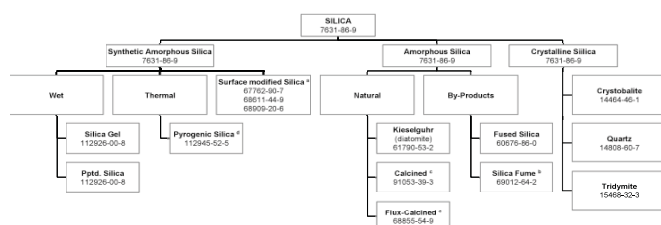
Concernant les crèmes solaires contenant du TiO₂ nanoparticulaire en général :

Il faut également préciser que, vis-à-vis de l'environnement, la quantité de nanoparticules issues des crèmes solaires ne représente que 0,1 % de la totalité de la production nationale de TiO₂ (AFSSET, 2008).

6.6 Produit alimentaire et silice

La silice existe sous des formes cristallines et amorphes. La silice cristalline est abondante dans la plupart des types de roches (granit, grès), dans le quartz, dans le sable ainsi que dans les sols. Une exposition excessive à la silice cristalline a été reliée à des maladies pulmonaires telles que la silicose, la tuberculose, la bronchite chronique, la maladie pulmonaire obstructive chronique et le cancer du poumon. Sur la base de plusieurs études de toxicité, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé la silice cristalline comme cancérigène de groupe 1 (cancérigène certain pour l'homme).

Les silices amorphes, non-cristallines, sont généralement d'origine synthétique (silices amorphes de synthèse - SAS) et sont commercialisées depuis les années 1950 avec une production mondiale actuelle supérieure à 1 Mt / an. Les silices amorphes peuvent être divisées en 2 catégories, les silices naturelles (*i.e.* terre de diatomée) et les silices fabriquées intentionnellement, *i.e.* les silices amorphes synthétiques (SAS). Ces dernières peuvent elles-mêmes être classées en SAS précipitées, pyrogénées (« thermique » ou « fumée ») et en silices modifiées chimiquement ou physiquement (Poma A., Di Giorgio M.L., 2008). Les SAS ont de nombreuses applications industrielles comme agents de renforcement ou épaississants dans divers systèmes (élastomères, résines, peintures et encres) ou dans la clarification de la bière et du vin. Elles peuvent être également utilisées comme agent fluidifiant et entrent dans la composition de nombreux produits de consommation tels que des produits cosmétiques, pharmaceutiques, des pâtes dentifrices et sont aussi retrouvées telles quelles dans certains aliments ou utilisées comme additifs alimentaires (INRS, 2007; OCDE, 2004).



^a toutes les formes de SAS peuvent être traitées en surface soit physiquement, soit chimiquement.

^b sous-produit de four électrique

^c transformation partielle en cristobalite

^d synonyme de pyrogénée dans certains pays

Les SAS hydrophiles peuvent être rendues hydrophobes après un traitement de surface.

Figure 21 : Différentes formes de silice avec le numéro CAS (d'après JACC 51)

Les SAS (CAS 7631-86-9), toutes confondues, ont fait l'objet de très nombreuses études. Les données de synthèse présentées ci-après sont principalement extraites des documents suivants :

- ECETOC JACC Document N° 51 (2006)⁵¹,
- SAS SI EPA Nano Submission, dossier de soumission volontaire à l'US EPA dans le cadre du NMSP (programme d'intendance pour les matériaux nanométriques, 2008)⁵².

6.6.1 Evaluation de l'exposition

Produits alimentaires et silice

La silice est utilisée en alimentaire pour différentes propriétés. Elle peut être employée par exemple comme anti-agglomérant ou modificateur de viscosité pour la sauce tomate, mais aussi les sauces vinaigrées. Cet additif est autorisé et employé depuis plusieurs dizaines d'années.

Il existe plus d'une quarantaine de produits nanosilice commerciaux ayant la fonction d'agent anti-agglomérant ou encore d'agent fluidisant dans différentes applications alimentaires.

Ces différentes nanosilices peuvent se retrouver sous la forme de nanoparticules individuelles et/ou d'agrégats, et/ou de perles nanostructurées. Les surfaces spécifiques associées à ces produits peuvent aller de quelques dizaines de m²/g à près de 350 m²/g. Enfin, ces nanosilices peuvent être hydrophiles ou hydrophobes.

⁵¹ <http://staging.idweaver.com/ECETOC/Documents/JACC%20051.pdf>

⁵² http://www.epa.gov/oppt/nano/sassia.pdf?bcsi_scan_16B740F25AA79220=0&bcsi_scan_filename=sassia.pdf

6.6.1.1 Caractérisation du produit sélectionné :

Le produit D étudié est un produit amont nanostructuré. Il est important de préciser que ce produit se présente sous la forme d'agglomérats de nanomatériaux. Les particules isolées ont des dimensions de l'ordre de 1 à 50 nm, les agrégats de 50 à 1 000 nm et les agglomérats, eux, de 1 à 50 µm.

Au stade de sa production, le produit ne se présente pas strictement sous forme de nanoparticules, mais d'agglomérats de nanoparticules. Ainsi, le statut « nano » en tant que tel de ce produit n'est pas systématiquement revendiqué par le producteur de silice. Cependant, si l'on considère les caractéristiques du produit D (en particulier les surfaces spécifiques associées), on identifie pourtant l'existence d'une structure nanométrique au sein de l'agglomérat considéré. D'autre part, les propriétés du produit sur lesquelles reposent la communication commerciale sont pour la plupart conférées par cette structure nanométrique.

C'est donc sur la base de la déduction de l'aspect nanostructuré, et non à partir d'une revendication formelle de la part du producteur, que ce produit et son producteur ont été identifiés.

Compte tenu de nombreux problèmes de traçabilité imputables pour une large part à la non-explicitation du caractère « nano » du produit par le producteur, il n'a pas été possible d'identifier un produit fini disponible sur le marché français contenant ces silices. Cette difficulté à identifier un produit fini contenant le nanomatériau d'intérêt illustre le manque de traçabilité évident entre le produit manufacturé en amont et son intégration dans la formulation d'un produit fini destiné à être mis sur le marché. Le lien entre les producteurs de nanomatériaux et les revendeurs de produit fini s'avère très complexe à établir, notamment en raison de l'absence de communication de cet aspect « nano » de la part du producteur envers son client, ce qui semble systématiquement entraîner une absence de revendication pour les produits finis confectionnés à partir de ces silices.

Par conséquent, il a été décidé de réaliser l'évaluation de risque, non pas sur un produit fini réalisé avec ces silices, mais sur la silice non encore intégrée dans un produit fini. Le produit D, de marque D1, est donc une silice, produit amont, destinée à être intégrée dans des formulations alimentaires pour son rôle d'anti-mottant⁵³. Une des applications visées est le sucre de table (application citée par le producteur D1 lors de l'audition du 25 septembre 2009). Le groupe de travail n'a pas pu accéder à la teneur exacte de silice mise en œuvre par les clients qui l'intègrent dans des formulations pour la fabrication de produits alimentaires, mais elle ne devrait néanmoins pas dépasser 1 %⁵⁴ (massique), limite réglementaire.

6.6.1.2 Définition du scénario d'exposition pour l'homme :

L'application considérée est donc l'application alimentaire (le sucre de table), la silice constituant un ingrédient (additif alimentaire) de ce produit fini. Dans le cas de l'utilisation du sucre de table, nous ne considérerons que la voie d'exposition par ingestion, qui est la voie d'exposition principale, comme cela a été indiqué dans la méthodologie employée.

Cependant, il convient de mentionner que des voies d'exposition secondaires pourraient exister en fonction du type de produit :

- l'exposition cutanée avec la manipulation d'ingrédients lorsqu'ils se retrouvent sous forme de poudres. Il y a des exemples de plantes aromatiques broyées et séchées pour lesquelles de la nanosilice a été ajoutée (propriétés hydrophile de la nanosilice fonctionnalisée) ;

⁵³ Additifs qui, dans une denrée, limitent l'agglomération des particules

⁵⁴ Information obtenue lors de l'audition du producteur D1 : directive 95/2/CE du parlement européen et du conseil du 20 février 1995 concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants

- l'exposition par inhalation. De la même façon, la manipulation de certaines poudres alimentaires est connue pour émettre des particules dans l'air (exemple du sucre glace).

D'un point de vue qualitatif, l'état des données disponibles ne permet pas de caractériser correctement ce à quoi est réellement exposé le consommateur. En effet, la dénomination commerciale du produit fini considéré (sucre) n'ayant pas été identifiée, aucune caractéristique des nanomatériaux intégrés à ce produit n'est disponible (concentration précise massique de la silice dans le produit fini, enrobage des particules, fonctionnalisation éventuelle *etc.*). Le mode d'utilisation du produit (cuisson par exemple) pourrait également fortement modifier ces paramètres physico-chimiques initiaux. De plus, nous ne disposons d'aucune donnée concernant le comportement de ce type d'agglomérat dans un milieu acide (pH de l'estomac) ou ses interactions avec le bol alimentaire. La caractérisation de l'étape d'absorption se révèle complexe.

Sur le plan quantitatif, pour des raisons identiques, nous ne connaissons ni la quantité par prise ni la quantité journalière absorbée. Il s'avère donc impossible d'estimer une dose à partir des informations obtenues. Nous pouvons néanmoins mentionner que l'exposition par voie orale risque d'être élevée, puisque ce sont des produits de consommation courante. Si nous ne considérons que le sucre de table, l'exposition est sans doute plus réduite. En effet, il faut tenir compte des autres produits alimentaires susceptibles de contenir le produit D.

A ce point de l'élaboration du scénario, trop d'éléments manquent pour construire un scénario d'exposition réaliste.

6.6.1.3 Définition du scénario de dispersion environnementale :

D'éventuels rejets peuvent être effectués dans les eaux (lavage de vaisselle notamment), mais principalement dans les déchets ménagers (jusqu'aux usines d'incinération d'ordures ménagères - UIOM). La dispersion dans les sols est supposée quasi inexistante. L'exposition pour l'environnement semble donc limitée.

Discussion / conclusion

En plus des problèmes de traçabilité qui ont été évoqués ci-dessus par rapport à l'identification d'un produit fini contenant des nanoparticules de silice agglomérées ou non, il est important de préciser que le produit D considéré existe depuis longtemps sur le marché. Cependant, aucune donnée n'est disponible sur les quantités potentiellement ingérées.

L'audition des producteurs du produit D a particulièrement souligné le fait que les industries productrices de silices amorphes synthétiques communiquent avec leurs clients (intégrateurs) plutôt en terme de propriétés physicochimiques que sont censés apporter les SAS aux produits finis (effet anti-mottant dans le cas étudié ici) qu'en terme de caractéristiques physicochimiques. En quelques mots, les SAS sont commercialisées en tant que propriétés spécifiques et non en tant que nanomatériaux.

Cette particularité de communication, expliquant l'absence de revendication explicite du caractère nanostructuré du produit, est justifiée par les industriels sur le fondement de plusieurs considérations. D'une part, historiquement les SAS ont été exploitées de manière industrielle bien avant l'émergence des préoccupations sanitaires vis-à-vis des nanomatériaux. D'autre part, sur le plan industriel, les clients intégrateurs fondent le plus souvent la sélection des SAS qu'ils incorporent sur leurs propriétés plutôt que sur leur caractérisation physicochimique fine. Enfin, les industriels considèrent les SAS comme des agglomérats indissociables de nanoparticules de silices, c'est à dire des particules nanostructurées mais de diamètres apparents supérieurs à l'échelle nanométrique, catégorie de particules ne répondant pas, suivant l'interprétation de beaucoup d'entre eux, à la définition des nanomatériaux.

L'ELC (*Federation of European Food Additives, Food Enzymes and Food Cultures Industries*⁵⁵ ; *section Food additives and nanotechnologies*) donne pour exemple la silice (E 551) qui a été approuvée depuis longtemps comme agent anti-agglomérant pour certaines applications dans les ingrédients alimentaires en poudre. Au cours de sa production, des particules primaires de taille nanométrique formées temporairement s'agglomèrent ensuite pour donner des structures de plus grandes tailles. La silice sous cette forme a été évaluée et approuvée comme additif alimentaire sans danger depuis de nombreuses années.

D'après l'ELC : « Un additif alimentaire n'est jamais consommé en tant que tel mais toujours intégré à un faible pourcentage dans les denrées et boissons alimentaires complexes. Le seul cas potentiel où la taille serait un critère déterminant pour le statut « nano » est celui où la taille de l'additif est délibérément conçue pour obtenir un effet physiologique spécifique, c'est à dire des substances potentielles qui sont à la fois des additifs alimentaires et des substances nutritives. »

En ligne avec les développements scientifiques les plus récents en la matière, l'ELC considère que le critère de taille est insuffisant et inadéquat pour qualifier le statut « nano » d'un additif alimentaire : de nombreux autres aspects doivent être considérés, en particulier :

- la production doit être intentionnelle (l'additif est délibérément créé comme forme nano) ;
- les propriétés doivent être caractéristiques de l'échelle nanométrique (propriétés nouvelles et non connues pour le matériau brut) ;
- une approche basée sur les risques : mettre l'accent sur les nanomatériaux insolubles ou persistants puisque les matériaux qui sont solubles dans l'eau ou qui sont biodégradables ne présentent pas de risques nano-spécifiques.

L'ELC conclut que, selon la définition proposée par le Parlement européen à la suite de leur première lecture de la proposition de la Commission relative au règlement sur les nouveaux aliments (*Novel Foods*, 2009), il n'y a pas d'additifs alimentaires produits par la nanotechnologie.

Il faut néanmoins souligner que les agrégats et agglomérats de SAS doivent être considérés comme des entités nano-structurées.

6.6.2 Évaluation du danger

Les données de la littérature sur l'écotoxicité des silices amorphes synthétiques (SAS) sont extraites principalement des documents :

- ECETOC JACC Document N° 51 (2006),
- SAS SI EPA Nano Submission, dossier de soumission volontaire à l'US EPA dans le cadre du NMSP (programme d'intendance pour les matériaux nanométriques, 2008).

Il convient de mentionner qu'aucune donnée ne porte précisément sur le produit D spécifiquement étudié, ce malgré sa large diffusion à travers les nombreux produits de consommation courante auxquels il est intégré, et qu'aucune caractérisation spécifique liée au caractère nanométrique des particules utilisées n'a été effectuée. Par ailleurs, ces études sont relativement anciennes.

Quelques travaux existent néanmoins sur l'écotoxicité des nanoparticules de silice (SiO₂) synthétisées en laboratoire. Il convient également de souligner que l'on peut trouver sur les sites de producteurs, pour une même dénomination de silice synthétique, des revendications commerciales portant tant sur des applications dans le domaine alimentaire que dans le domaine des insecticides, pesticides et fongicides.

⁵⁵ http://www.elc-eu.org/PDF/Food_additives_and_nanotechnologies_-_ELC_position.pdf

6.6.2.1 Danger pour l'homme

6.6.2.1.1 Profil toxicologique général du nanomatériau

Toxicité :

La toxicité par voie orale des silices amorphes de synthèse (SAS) demeure faible contrairement à celle des silices cristallines avec une absence d'indication d'un pouvoir silicogène pour les silices amorphes industrielles (INRS, 2007). Le CIRC a conclu que : « compte tenu des données actuellement disponibles, les silices amorphes de synthèse ne peuvent pas être classées quant à leur potentiel cancérigène chez l'homme ». Néanmoins, la littérature récente révèle que la silice amorphe peut présenter un problème de toxicité à des niveaux de doses élevées par voie orale avec un effet toxique sur le foie (So S.J., 2008). Les résultats obtenus lors des études de bio distribution confirment que le foie, mais aussi la rate, sont les principaux organes cibles lors de l'administration chronique de nanoparticules de silice (Cho M., 2009; Nishimori H., 2009; Nishimori H., 2009).

Génotoxicité :

Concernant la génotoxicité, les tests effectués et présentés dans le document JACC51 (ECETOC, 2006) utilisent le plus souvent des méthodes standard et n'ont mis en évidence aucune génotoxicité des SAS étudiées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant, des remarques concernant ces études effectuées peuvent être formulées.

Tout d'abord, concernant le test d'Ames, celui-ci n'apparaît pas judicieux quant à la mise en évidence d'une activité mutagène des particules nanométriques. En effet, à ce jour, nous ne disposons d'aucune preuve de pénétration des nanoparticules dans la bactérie et les comportements de la suspension nanoparticulaire avec le gel d'agar sont inconnus.

D'autres études récentes utilisant le test des comètes ont démontré que les nanoparticules de silice, dont la taille varie de 20 à 400 nm, n'induisaient pas de génotoxicité significative (Barnes C.A., 2008), mais pouvaient entraîner une inhibition de la réplication, de la transcription, et de la prolifération cellulaire (Chen M. et von Mikecz A., 2005). Des interférences d'ordre mécanique avec le fuseau mitotique et l'ADN ont déjà été identifiées comme un mode d'action des particules micrométriques et du fait de leur gamme de taille nanométrique, il est communément admis que les nanoparticules sont capables d'interagir et éventuellement d'interférer avec des constituants cellulaires de dimension comparable tels que les nucléosomes, les microtubules, les filaments d'actine et les centrosomes. Ainsi, l'interférence avec ces structures peut mener à un dysfonctionnement de la division cellulaire et perturber le trafic cellulaire (Gonzalez L., 2008).

Concernant les tests réalisés *in vivo* (ECETOC 2006 ; US EPA, 2008), l'ensemble des études a été effectué sur une seule SAS colloïdale, *i.e.* Syloid 244. Aucun test réglementaire n'a été mené sur des SAS pyrogénées ou précipitées. Par ailleurs, les organes étudiés n'apparaissent pas pertinents au regard des essais de bio distribution disponibles dans la littérature qui ont permis de déterminer que les principaux organes cible sont le foie et la rate, ceci après des traitements uniques ou répétés par voie intraveineuse (Cho M., 2009; Nishimori H., 2009a; Nishimori H., 2009b).

Ainsi, concernant précisément le test du micronoyau *in vivo*, même si la moelle osseuse constitue un organe systémique, ce choix n'apparaît pas pertinent puisqu'il n'est pas un organe cible. Au cours de cette étude, aucune preuve formelle d'exposition de la moelle osseuse n'a été fournie.

De la même façon, le test du dominant létal chez le rat s'intéresse exclusivement aux mutations létales dominantes survenant au niveau des cellules germinales. C'est donc un test spécifique par rapport au tissu étudié, *i.e.* les cellules germinales, qui ne sont pas toujours les mieux exposées et qui ne représentent pas un organe cible majeur. Comme pour le test du micronoyau, aucune preuve formelle d'exposition des animaux n'est donnée.

Enfin, le test « *host-mediated* » n'est pas un test réglementaire. Il a été utilisé pour étudier la mutagenèse de produits après activation par les systèmes métaboliques *in vivo*. Les micro-organismes permettant de montrer une éventuelle activité mutagène sont en contact avec le(s) métabolite(s) mutagène(s) très peu de temps, ce qui rend ce système d'essai peu sensible. De plus, ce test utilise des bactéries qui, comme cela a été souligné précédemment, ne semblent pas adaptées à la mise en évidence du potentiel génotoxique. Enfin, aucune preuve formelle d'exposition des animaux n'est fournie.

Il apparaît nécessaire d'obtenir des indications claires quant au potentiel génotoxique en mettant en œuvre une batterie de tests standardisés qui permettraient de quantifier les différents types d'aberrations génétiques couvrant toutes les formes possibles de lésions de l'ADN pouvant être induites après exposition aux nanoparticules (Singh N., 2009). Par exemple, étant donné les résultats obtenus lors des études de bio distribution, la génotoxicité devrait être évaluée au niveau du foie ainsi qu'au niveau d'un organe directement exposé tel qu'un organe du tractus digestif (estomac, duodénum, etc.).

Pourtant, comme le souligne le rapport du CPP (Comité de la Prévention et de la Précaution), les interactions dépendent fortement de la nature et de la dimension des particules, ce qui nécessite un approfondissement des connaissances dans le cas des nanoparticules (CPP, 2006). De plus, il semble qu'à masse égale et à composition chimique et forme identiques, la réponse biologique (stress oxydant, réponses pro-inflammatoires ou cytotoxiques, transformation cellulaire) augmente avec la surface spécifique des particules aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Park M.V.D.Z., 2009; Singh N., 2009; Waters K.M., 2009; Park E.J., Park K., 2009). Ainsi, les agrégats et agglomérats de SAS doivent être considérés comme des entités nano-structurées et, d'autre part, la quantité de nanoparticules élémentaires et/ou d'agrégats de taille nanométrique qu'ils peuvent contenir devrait être connue.

Cancérogenèse / Reprotoxicité :

Des études de cancérogenèse et de toxicité pour le développement de SAS (gel et précipitée) ont été réalisées par voie orale chez différentes espèces.

Chez la souris B6C3F1 et le rat Fischer, la SAS gel (Syloïd 244) administrée dans l'alimentation pendant 21 mois à 0, 1,25, 2,5 ou 5 % n'a induit aucune augmentation significative des lésions néoplasiques ou non néoplasiques dans les tissus examinés.

Aucune tumeur maligne n'a été observée au cours d'une étude réalisée sur la SAS hydrophobe (Aérosil R972) chez le rat Wistar exposé à 100 mg / kg / j *via* l'alimentation pendant 24 mois. Aucune différence dans le type et/ou dans le nombre de tumeurs bénignes n'a été observée par rapport aux contrôles. Aucune lésion sur d'autres organes n'a été signalée (ECETOC, 2006).

Dans toutes les études effectuées sur la SAS gel, aucune mortalité ou variation significative de gain de poids chez les mères traitées n'a été retrouvée. Aucune différence significative entre le nombre de corps jaunes (mesurée chez le lapin seulement), le pourcentage d'implantation et / ou de résorption et le poids des petits vivants n'a été notée par rapport aux contrôles. Le nombre d'anomalies externes, viscérales ou squelettiques des groupes traités ne diffère pas des contrôles (ECETOC, 2006).

L'étude sur SAS précipitée (Aérosil R972) a été effectuée sur rats *Wistar* femelles ayant reçu des doses quotidiennes de 500 mg / kg de SiO₂ dans l'alimentation pendant 8 ou 17 semaines avant l'accouplement avec des mâles ayant eux-mêmes été soumis à une exposition semblable pendant 4,5 mois. Le traitement a été poursuivi au cours de l'élevage. Les animaux de la génération F0 n'ont pas été affectés par le traitement quel que soit le paramètre considéré. Aucun effet relié au traitement au niveau de la taille de la portée ou du poids à la naissance n'a été rapporté. Aucune anomalie clinique, comportementale significative n'a été observée chez les petits à la naissance. Le développement de la descendance s'est révélé normal et aucune modification liée au traitement n'a été observée chez les petits de 4 semaines, pour les deux générations (ECETOC, 2006).

Aucune étude spécifique sur la toxicité pour la fertilité n'est disponible.

En conclusion, à ce jour, les SAS n'ont pas été classées comme cancérigènes ou dangereuses pour l'homme par le CIRC.

Stabilité :

Concernant la stabilité, d'une façon générale, la silice amorphe est stable entre pH 1 et pH ~ 7 - 8 c'est à dire à l'équilibre avec une concentration en ion H_3SiO_4^- de $3 \cdot 10^{-4}$ mole / l. La silice possède un PCN⁵⁶ autour de pH = 2. Pour des pH > 2 la silice est chargée négativement. Au delà de pH ~ 7 la silice est solubilisée et à pH ~ 10 la concentration à l'équilibre des ions $\text{H}_2\text{SiO}_4^{2-}$ est de 10^{-2} mole / l. À pH acide (voisin de 2 ou 3), l'agrégation est assurée par la diminution des répulsions, par le fait que les sites Si-O⁻ ont une charge négative compensée par l'adsorption d'un proton H⁺ (Iler R.K.1979).

L'action de molécules plus complexes, comme les protéines, concourent au même processus : les fonctions amines s'adsorbant sur les sites précédents et pontant des nanoparticules entre elles. La différence viendra des effets stériques (encombrement et répulsion des protéines entre elles). Des agrégats fractals dont la structure et la taille vont dépendre de nombreux paramètres (charge de la protéine, l'affinité, la masse molaire par rapport à la taille des nano silice) vont apparaître (Iler R.K., 1979).

6.6.2.1.2 Evaluation du danger nano spécifique du produit fini

Pour les SAS étudiées, aucune donnée de stabilité des agrégats / agglomérats n'est disponible (SAS telles quelles ou en solution, à différents pH, y compris des pH acides mimant celui d'un estomac par exemple).

Les formes solides de SAS manufacturées sont constituées majoritairement de particules agrégées et agglomérées. On estime que la taille des particules élémentaires varie entre 5 et 100 nm, la taille des agrégats fluctue de 0,1 à 1 µm et celle des agglomérats de 1 à 250 µm. A ce jour, aucune revendication « nano » n'est spécifiée par les industriels et il est important de préciser que pour l'ensemble des études réglementaires, il semble qu'aucune caractérisation spécifique liée au caractère nanométrique des particules utilisées n'a été effectuée (surface spécifique, etc.).

6.6.2.2 Danger pour l'environnement

6.6.2.2.1 Données écotoxicologiques du nanomatériau étudié

Micro-organismes

Une étude très ancienne de 1970 a évalué l'effet antibactérien de SAS, de pureté élevée, pressée et non pressée (Aerosil, sans précision) vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aerobacter aerogenes*, *Micrococcus pyrogenes aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyrogenes humanus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*). Les micro-organismes Gram-négatif⁵⁷ (*Escherichia coli*, *Bacterium proteus* *Pseudomonas aeruginosa* et *Aerobacter aerogenes*) moururent entre 6 heures et 3 jours après leur exposition aux SAS alors que ceux Gram-positif étaient plus résistants. De plus, la survie des bactéries était plus courte avec les SAS non pressées (Kienholz M.N., 1970).

Plus récemment, Adams *et al.* (Adams L.K., 2006) ont conduit avec *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* une étude comparative de la toxicité (pourcentage d'inhibition de la

⁵⁶ valeur du pH pour laquelle la charge de surface est nulle.

⁵⁷ La paroi des bactéries à Gram- montre une structure différente de la paroi de celles à Gram+. Elles possèdent une membrane externe en plus du peptidoglycane (structure commune aux Gram+ et Gram-).

croissance) de nanoparticules de SiO₂, TiO₂ et ZnO. La caractérisation (taille des nanoparticules) dans le milieu d'exposition des bactéries a été réalisée par microscopie électronique à transmission. Pour chacune des nanoparticules, une gamme de concentration variant de 10 à 5 000 mg / l a été testée. Les résultats ont montré que la toxicité des nanoparticules de SiO₂ était inférieure à celle induite par les nanoparticules de TiO₂ et plus encore par celles de ZnO. En effet, chez *Bacillus subtilis* ce n'est qu'à partir de 1 000 mg / l, que 7 % d'inhibition de la croissance ont été observés en réponse à l'exposition aux nanoparticules de SiO₂ (205 nm) contre 75 % pour celles de TiO₂ (330 nm). Avec *Escherichia coli*, 15 % d'inhibition de la croissance ont été notés à partir d'une exposition des bactéries à 500 mg / l de nanoparticules de SiO₂ ou TiO₂, contre 38 % pour celles de ZnO. Le stress oxydant via la formation d'espèces réactives à l'oxygène serait responsable de la toxicité observée.

Organismes aquatiques

Chez les poissons (*Brachydanio rerio*), les crustacés (*Daphnia magna*) et les algues (*Scenedesmus subspicatus*), l'écotoxicité de différents types de SAS de nature hydrophobe (Aerosil R972, Aerosil R974) ou hydrophile (Aerosil 200 et VN3 Ultrasil ; pureté 100 % et 98 % respectivement), a été évaluée au moyen de différents tests, conformément aux lignes directrices de l'OCDE (OCDE TGD N°201, 202 et 203) et dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire (OCDE, 1982; OCDE, 1984a; OCDE, 1984b; OCDE, 1984c). Les résultats des tests de toxicité aiguë n'ont montré aucun effet pour des concentrations nominales de 1 000 mg / l chez les daphnies et 10 000 mg / l chez les poissons et les algues (Degussa, 1992b; Degussa, 1992c; Degussa, 1992a; Degussa, 1999). Chez les algues vertes, des cellules de deux souches : i) SA-3 issue d'une symbiose avec *Paramecium bursaria* et ii) *Chlorella vulgaris* c-27 ont été cultivées de façon asynchrone en présence de 0,01 % d'Aerosil A-300 (100 mg / l) pendant 9 à 12 jours. Les conditions de cette étude ont été différentes de celles d'un test standardisé OCDE, puisque les algues ont été incubées dans un milieu peu nutritif, les cultures ne progressant pas de façon exponentielle. Les résultats ont montré que l'Aerosil stimule la prolifération des algues par une accélération de leurs cycles de vie (Gerashchenko B.I., 2002).

Une étude récente a montré que la taille des nanoparticules de SiO₂ (silice colloïdale LUDOX LS et LUDOX TM40) conditionne leur toxicité vis-à-vis de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* (Van Hoecke K., 2008). L'écotoxicité de ces nanoparticules a été estimée au moyen du test standardisé d'inhibition de la croissance algale (OCDE TGD N°201). Les distributions de taille des nanoparticules de SiO₂ dans le milieu d'exposition ont montré que celles provenant de LUDOX LS avaient un diamètre moyen de 12,5 ± 0,2 nm et celles de LUDOX TM40 un diamètre moyen de 27 ± 0,5 nm. Les valeurs des CE20 étaient significativement plus faibles (CE20 = 20 ± 5,0 mg / l) dans le cas d'une exposition pendant 72 h à des nanoparticules de SiO₂ de 12,5 nm par comparaison avec celles (CE20 = 28,8 ± 3,2 mg / l) mesurées avec les nanoparticules de 27 nm de diamètre. En revanche, lorsque les CE20 sont exprimées en fonction de la surface, aucune différence significative n'a été observée entre les nanoparticules de 12,5 nm (CE20 = 4,7 ± 1,2 m² / l) et 27 nm (3,9 ± 0,4 m² / l). La microscopie électronique à transmission a permis de montrer une adhésion des nanoparticules de SiO₂ à la surface des algues mais aucun transport à l'intérieur des cellules n'a été observé.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de données disponibles concernant des tests de toxicité chronique chez des espèces aquatiques.

Organismes terrestres

La toxicité spécifique des SAS vis-à-vis des insectes a été étudiée principalement en raison de l'utilisation de la silice comme support de biocides dans certaines formulations d'insecticides. L'écotoxicité de SAS pyrogénées (HDK, HDK N20, Cab-O-Sil série), précipitées (Sipernat 22), et gélifiées (série Gasil) a été testée chez la blatte (*Blattella germanica*). La mortalité a été mesurée après 24 heures d'exposition, à 30°C et 75 %

d'humidité relative. Il n'y avait pas de groupe témoins au cours de cette étude. Les valeurs de la DL50 étaient comprises entre 23 et 786 mg / cm² de SAS, selon les échantillons de silice. Les SAS n'étaient pas toxiques lorsque l'humidité atteignait 95 % ou lorsque de l'eau était fournie aux organismes. De plus, aucune toxicité par ingestion de SAS vis-à-vis de *B. germanica* n'a été montrée. Il a été suggéré que les SAS s'adsorbent à la cuticule des organismes, les rendant plus vulnérables à la déshydratation (Le Patourel G.N.J. et Zhou J.J., 1990). Cette hypothèse de la déshydratation de l'insecte a également été développée dans une autre étude, où les auteurs (Gowers S.L. et Le Patourel G.N.J., 1984) ont étudié l'accumulation de SAS (Sipernat 22S) sur le corps du charançon (*Sitophilus oryzae*) se déplaçant dans des parcelles de blé traitées par la silice (150 mg / kg de blé). La masse de la silice portée par les coléoptères après 48 heures d'exposition était de 3,83 mg / insecte et aucune mortalité n'a été observée parmi les insectes, en raison de la forte humidité du blé. Dans certains cas, la silice accumulée sur les insectes semblait davantage translucide qu'opaque, et les auteurs ont interprété cette caractéristique comme étant due à la saturation de la silice avec des lipides de la cuticule. Sur la base de cette observation, les SAS agiraient en s'adsorbant à la cire cuticulaire des insectes, les rendant ainsi plus vulnérables à la dessiccation (Le Patourel G.N.J., 1989).

Toutefois, ces études ont été classées CoR 3a (documentation insuffisante pour l'évaluation) et CoR 3b (déficiences quant aux méthodologies employées) (ECETOC, 2006).

Stabilité :

Dans les milieux aquatiques (environnementaux ou biologiques), la silice, comme tous les minéraux, est soumise à des interactions avec les solutés simples ou complexes.

En présence de cations simples (Na⁺, Ca, K, etc.) la silice, du fait de sa charge négative, va s'agréger en formant des agrégats fractals 3D, les particules de SiO₂ pouvant se rapprocher du fait de l'écrantage des charges négatives par l'adsorption de cations sur les sites Si-OH et Si-O⁻ (Iler R.K., 1979).

6.6.2.2 Evaluation du danger nano spécifique du produit fini

Ne disposant pas de données spécifiques au produit étudié, nous ne pouvons pas aujourd'hui conclure sur les dangers environnementaux associés à l'utilisation de ce produit.

6.6.3 Évaluation du risque

6.6.3.1 Discussion des résultats

Comme cela a été mentionné ci dessus, étant donné le manque de connaissance sur les caractéristiques du produit D dans un produit fini et le manque de données sur son utilisation (homme et environnement), le groupe de travail n'a pas été en mesure d'établir des scénarios d'exposition, même qualitatifs, à un produit fini qui contiendrait le produit D (silice majoritairement sous forme d'agglomérats). La seule information dont le groupe de travail dispose est que ce produit de marque D1 est destiné à être intégré dans des formulations alimentaires pour son rôle d'anti-mottant et que, selon les normes réglementaires, la teneur en silice ne devrait pas dépasser 1 % en masse dans le produit fini. Même si l'exposition n'a pas pu être estimée, elle ne doit pas être négligée.

Concernant le danger pour l'homme, aucune donnée spécifique au produit D n'est disponible. L'ensemble des tests semblant nécessaires à une caractérisation complète du danger des silices amorphes n'ayant pas été réalisé, les données ne permettent donc pas d'exclure un danger pour la santé humaine lié à une exposition à des nanoparticules de silices amorphes ou à des agglomérats.

En l'absence de ces données, le danger pour l'homme lié au produit D ne peut être exclu.

Concernant le danger pour l'environnement, compte tenu :

- des propriétés physicochimiques des SAS ;

- de l'ubiquité des silices dans l'environnement ;
- de l'absence de données écotoxicologiques, spécifiques au produit D et/ou sur les nanoparticules de silice sous forme d'agglomérats et/ou sur les nanoparticules de silice amorphes,

il n'est pas possible de conclure sur l'écotoxicité potentielle d'une exposition à court et/ou long terme d'organismes, le danger pour l'environnement ne peut donc être exclu.

Le groupe de travail n'a pu réaliser une évaluation des risques pour le produit D. Le risque ne peut être exclu, ni pour l'homme, ni pour l'environnement.

6.6.3.2 Discussion et identification des incertitudes

Scénario homme :

Si la silice a été évaluée et approuvée comme additif alimentaire il y a de nombreuses années, la majorité des études de toxicité présentées dans des documents (ECETOC, 2006 ; OCDE, 2004) portent sur diverses SAS colloïdales, précipitées et/ou pyrogénées indistinctement. Celles-ci ont été prises comme une entité unique, identique, sans distinction. Dans la pratique, chaque type de nanoparticule devrait être actuellement considérée comme unique et devrait faire l'objet d'une investigation toxicologique spécifique indépendante des tests toxicologiques traditionnels déjà réalisés sur les espèces chimiques entrant dans la composition de ces particules (CPP, 2006).

Par ailleurs, étant donné que lors des études de bio-distribution les nanoparticules de silice sont retrouvées sous forme d'agrégats dans le foie et la rate, il serait nécessaire :

- d'apporter des informations complémentaires sur les modalités de pénétration des nanoparticules dans l'organisme animal, en particulier l'existence de passages à travers la muqueuse intestinale (type de mécanismes, *i.e.* passif ou actif, circonstances facilitant la pénétration et leur importance) ;
- d'effectuer des études complémentaires de toxicité et en particulier de génotoxicité au niveau du foie ainsi qu'au niveau d'un organe directement exposé, tel qu'un organe du tractus gastro-intestinal (estomac, duodénum, côlon).

Il apparaît aussi nécessaire de mettre en œuvre des études de caractérisation et surtout de détermination des propriétés physico-chimiques des SAS utilisées incluant les éventuels processus de désagglomérations / désagrégations. Dans un second temps, et en fonction des résultats, des essais toxicologiques complémentaires (toxicité chronique, reprotoxicité, *etc.*) pourraient s'avérer nécessaires.

Certains points peuvent être également mentionnés :

- les formes solides de SAS manufacturées sont majoritairement sous forme de particules agrégées et agglomérées ;
- même si le produit D existe depuis un certain nombre d'années et qu'aucune toxicité n'a été directement reliée à son utilisation, il est important de rappeler qu'en dehors d'effets spécifiques, l'éventuelle toxicité (surtout liée à une exposition chronique) d'une substance est difficile à mettre en évidence dans une population générale en raison de nombreux facteurs confondants (co-exposition à d'autres substances, mode de vie, *etc.*) ;
- il est probable qu'une partie non négligeable de la population soit exposée au produit D dans une quantité potentiellement significative, étant donné que le produit D est destiné à être intégré dans des produits alimentaires de différents types, dont certains sont de consommation courante.

Scénario environnement :

La dispersion environnementale des SAS intégrées aux produits alimentaires est supposée relativement faible, notamment en raison de l'existence des infrastructures de gestion de la fin de vie de ces produits (UIOM, stations d'épuration des eaux usées).

Cependant, certaines applications de ces mêmes silices alimentaires visent des effets insecticides, pesticides et fongicides et contribueraient ainsi à augmenter la dispersion environnementale de ces nanomatériaux.

6.6.3.3 Conclusion

Chez l'homme et pour l'environnement, pour les effets et le produit considérés dans l'étude, le risque, s'il ne peut pas être évalué, ne peut pas être exclu.

6.7 Discussion et conclusion sur les cas étudiés

Le groupe de travail a rencontré de grandes difficultés quant à l'identification de produits contenant des nanomatériaux manufacturés. Le manque de traçabilité a été souligné plusieurs fois. Ceci va de pair avec les problèmes actuels d'interprétation du terme « nanomatériau » (*i.e.* : cas de la silice nanostructurée) par certains industriels.

Lorsque le produit est identifié, il faut rappeler que l'accès aux données de caractérisation est très limité. Les outils existants ne sont pas suffisants et ne permettent pas d'obtenir une caractérisation aussi précise que celle exigée pour en évaluer les risques associés.

Il a donc été difficile de caractériser le nanomatériau à chaque étape du cycle de vie et de réaliser des scénarios pertinents et complets pour les produits finis considérés. Cependant, le groupe de travail a pu constater que, pour un produit fini, seule la connaissance complète de son cycle de vie permet de caractériser le risque associé.

Une autre difficulté provient du fait que la présence de nanomatériaux dans le produit n'implique pas nécessairement que ce produit soit source d'émission de nanomatériaux. De plus, l'estimation de l'exposition réelle pour le consommateur s'effectue avec le nanomatériau sortant. Ainsi, si les données toxicologiques et écotoxicologiques du nanomatériau entrant sont nécessaires pour réaliser l'évaluation de risque sur le produit fini, les données sur le nanomatériau sortant sont indispensables.

Nombreux sont les travaux toxicologiques et écotoxicologiques analysés au cours de cette étude pour lesquels les travaux de caractérisation sont absents ou incomplets. Cependant, les articles les plus récents tendent à prendre de plus en plus en compte la caractérisation des nanomatériaux étudiés.

Les études de cas reposent la plupart du temps sur des études génériques (toxicologie et écotoxicologie) non propres au produit de consommation considéré.

La majorité des études sur l'écotoxicité des nanoparticules a été conduite avec des nanoparticules de synthèse et non issues du produit fini considéré. De plus, les concentrations sont si élevées qu'elles ne reflètent pas la réalité de l'exposition environnementale à ces contaminants. L'hétérogénéité des travaux et des effets selon les espèces, les protocoles, les nanoparticules et les doses considérés est à souligner. La caractérisation de l'exposition aux nanoparticules dans le milieu expérimental est indispensable dans l'analyse et l'interprétation des résultats obtenus.

Ce rapport a démontré la difficulté à réaliser des évaluations de risque en l'absence de données spécifiques, mais a également démontré la nécessité du caractère pluridisciplinaire de l'évaluation, notamment en l'absence de méthodologies dédiées.

Avec une évaluation de risque réalisée pour quatre produits différents, nous remarquons que le manque de données ne permet pas d'estimer le risque, ce qui n'autorise donc pas à l'exclure, ceci malgré les multiples compétences qui ont été rassemblées pour étudier chacun des différents produits étudiés.

On peut légitimement se poser la question de la possibilité pratique, pour des PME notamment, de réaliser ces évaluations de risque, en l'absence de moyens humains et financiers suffisants.

7 Recommandations du groupe de travail

Compte tenu du manque de données sur la dangerosité potentielle des nanoparticules pour l'homme et l'environnement, il serait souhaitable de prendre des mesures concernant :

- l'information des consommateurs sur les produits contenant des nanoparticules manufacturées (nano-produits) ;
- la limitation préventive de l'exposition des consommateurs et de l'environnement (en plus des salariés) ;
- l'incitation à la recherche dans les domaines de l'évaluation de l'exposition, de la toxicologie et de l'écotoxicologie.

Les recommandations suivantes s'appliquent à la fois aux nano-produits déjà sur le marché et aux futurs nano-produits. Par ailleurs, on ne considère ici que les nanoparticules manufacturées volontairement introduites dans les nano-produits, et non pas celles émises par la matrice des nano-produits.

Informers les consommateurs pour qu'ils puissent choisir de consommer ou de ne pas consommer des nano-produits. Donner au consommateur la possibilité de s'informer facilement sur la composition des nano-produits. Le groupe de travail recommande ainsi :

- d'envisager un étiquetage compréhensible pour les consommateurs, pertinent et spécifique des nanomatériaux présents dans le nano-produit considéré ;
- aux industriels de produire dès à présent une fiche descriptive des données concernant les nanoparticules utilisées dans leurs nano-produits (concentration, taille, nature, informations disponibles sur la toxicité, *etc.*). Les informations nécessaires devraient être fournies pour les différentes étapes du cycle de vie, notamment par des fiches de données de sécurité correctement renseignées. L'ensemble des fiches descriptives pourrait être disponible sur un seul site internet géré par un organisme public français.

Limiter l'exposition des consommateurs et de l'environnement. Le groupe de travail recommande :

- de construire un cadre normatif permettant de caractériser les émissions de nanoparticules par les produits contenant des nanomatériaux manufacturés sous contraintes d'usage normal et en fin de vie ;
- de limiter l'exposition des consommateurs aux produits contenant des nanomatériaux manufacturés ainsi que leur dissémination dans l'environnement, notamment :
 - ceux pour lesquels des produits équivalents en termes de fonction, d'efficacité et de coût ne contenant pas de nanoparticules existent ;
 - les produits dont l'utilité démontrée serait faible pour les consommateurs, sur la base d'une analyse socio-économique de type bénéfique / risque ;
 - les produits susceptibles de libérer des nanoparticules ou des espèces chimiques pouvant présenter un risque pour l'homme ou pour l'environnement au cours de leur utilisation, sous contrainte d'usage normal et en fin de vie. Le

critère de persistance dans l'environnement doit être également pris en compte, dans l'éventualité d'un impact à long terme.

Faire progresser les connaissances sur l'exposition et la dangerosité potentielle des nanoparticules.

- Le groupe de travail recommande le lancement d'un programme national de recherches spécifiques sur l'évaluation des risques potentiels pour l'homme et pour l'environnement induits par les nanoparticules manufacturées initiales introduites dans les nano-produits et celles susceptibles d'être relarguées réellement par les nano-produits.
- s'agissant des expositions, le groupe de travail recommande :
 - de mettre au point des méthodes de prélèvement, de détection et de caractérisation des nanoparticules dans les fluides biologiques et dans les différents compartiments environnementaux ;
 - de déterminer le relargage des nanoparticules des nano-produits sous contraintes d'usage et en fin de vie (combustion, mise en décharge, *etc.*) ;
 - de comprendre le devenir et le comportement (agglomération, transports physique et trophique, persistance, *etc.*) des nanoparticules susceptibles d'être relarguées dans l'environnement ;
 - d'étudier l'efficacité des filières de fin de vie des nano-produits : recyclage, stockage, efficacité des procédés d'incinération, *etc.*
- s'agissant de l'établissement de tests normalisés, le groupe de travail recommande d'encourager la participation des équipes de recherche françaises à la mise au point de protocoles expérimentaux normalisés, en relation avec les travaux conduits au niveau européen et mondial, concernant :
 - les nanoparticules types à utiliser pour les tests : nanoparticules manufacturées initiales et celles susceptibles d'être émises réellement par les nano-produits (nanoparticules parfaitement caractérisées et stables) ;
 - les méthodologies des tests *in-vitro* et *in-vivo* ;
 - les méthodes de prélèvement dans les nano-produits et l'environnement (air, eau, sol).
- s'agissant de la dangerosité des nanoparticules, le groupe de travail recommande :
 - de déterminer la toxicité et l'écotoxicité des nanoparticules initiales et celles susceptibles d'être émises réellement par les nano-produits, en termes de relation niveaux d'exposition / effets, pour des doses correspondant à des scénarios d'exposition appropriés ;
 - d'orienter les efforts de recherche sur les points clés identifiés en toxicologie pour les nanoparticules, à savoir la toxicocinétique, la détermination des mécanismes d'actions (permettant notamment la compréhension des interactions entre des nanoparticules parfaitement caractérisées et les biomolécules, nutriments, xénobiotiques) et l'étude des effets *in vivo* liés à des expositions aiguës et multiples incluant les marqueurs de l'inflammation, le stress oxydant et la prolifération cellulaire, avec pour objectif à terme la mise en œuvre de modèles prédictifs de substitution à l'expérimentation ;
 - d'étudier les effets des nanoparticules dans l'environnement au moyen d'organismes présentant des modes d'alimentation différents et en prenant en

compte les mécanismes de bioaccumulation, de bioamplification et d'interaction avec les autres contaminants.

- S'agissant de la standardisation des méthodes, le groupe de travail recommande :
 - de poursuivre le développement et la conception d'une grille de cotation permettant de calculer un score de risques nano-spécifiques associés à des produits de consommation ;
 - de réfléchir à une standardisation des nano-produits par un regroupement de ceux-ci par grandes catégories constituées sur la base d'un référencement des nanoparticules / nanomatériaux en fonction des paramètres essentiels les spécifiant. L'objectif est ainsi de réduire le nombre de degrés de liberté influant tant sur le niveau d'exposition que sur la toxicité et l'écotoxicité (par exemple, les nanoparticules présentant une fonctionnalisation interdisant une pénétration cutanée, ou encore les nano-textiles présentant une non dispersion dans l'environnement, *etc.*).

8 Bibliographie

- Aarestrup F.M., Kruse H., Tast E. *et al.* (2000). Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway. *Microb. Drug Resist.*; 6(1):63-70.
- ACGIH. (2005). Documentation of the TLVs and BEIs with other worldwide occupational exposure values. [CD-ROM].
- Adams L.K., Lyon D.Y., McIntosh A. *et al.* (2006). Comparative toxicity of nano-scale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions. *Water Sci. Technol.*; 54(11-12):327-34.
- ADEME. (2005). Introduction à l'Analyse du Cycle de Vie (ACV). Note de synthèse externe. 14 p.
- AFSSA. (2009). Nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale. Maisons-Alfort: AFSSA. 27 p.
- AFSSET. (2006). Les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. Maisons-Alfort: AFSSET. 248 p.
- AFSSET. (2008). Les nanomatériaux : sécurité au travail. Maisons-Alfort: AFSSET. 247 p.
- Ahamed M., Karns M., Goodson M. *et al.* (2008). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 233(3):404-10.
- Akdim B., Hussain S., Pachter R. (2008). A Density Functional Theory Study of Oxygen Adsorption at Silver Surfaces: Implications for Nanotoxicity. Proceedings of the 8th international conference on Computational Science, Part II. *Lect. Notes Comput. Sci.*; 5102:353-9.
- Almquist C.B., Biswas P. (2002). Role of Synthesis Method and Particle Size of Nanostructured TiO₂ on Its Photoactivity. *J. Catal.*; 212(2):145-56.
- Arora S., Jain J., Rajwade J.M. *et al.* (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol. Lett.*; 179(2):93-100.
- Arora S., Jain J., Rajwade J.M. *et al.* (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 236(3):310-8.
- Asharani P.V., Low Kah Mun G., Hande M.P. *et al.* (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*; 3(2):279-90.
- Auffan M.A., Rose J.Ã., Wiesner M.R. *et al.* (2009). Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ. Pollut.*; 157(4):1127-33.
- Baan R., Straif K., Grosse Y. *et al.* (2006). Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol.*; 7(4):295-6.
- Bar-Ilan O., Albrecht R.M., Fako V.E. *et al.* (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small*; 5(16):897-910.

Barlow P.G., Clouter-Baker A., Donaldson K. *et al.* (2005). Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. *Part. Fibre Toxicol.*; 2:11-24.

Barnes C.A., Elsaesser A., Arkusz J. *et al.* (2008). Reproducible Comet Assay of Amorphous Silica Nanoparticles Detects No Genotoxicity. *Nano Lett.*; 8(9):3069-74.

Barrena R., Casals E., Colon J. *et al.* (2009). Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*; 75(7):850-7.

Bender A.E., Bender D.A. (1995). *A Dictionary of Food and Nutrition*. Oxford: Oxford University Press. 424 p.

Benn T.M., Westerhoff P. (2008). Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environ. Sci. Technol.*; 42(11):4133-9.

Berg J., Tom-Petersen A., Nybroe O. (2005). Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Letts. Appl. Microbiol.*; 40(2):146-51.

Bhabra G., Sood A., Fisher B. *et al.* (2009). Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. *Nat. Nanotechnol.*; 4(12):876-83.

Bielmyer G.K., Brix K.V., Grosell M. (2008). Is Cl⁻ protection against silver toxicity due to chemical speciation? *Aquat. Toxicol.*; 87(2):81-7.

Blaser S.A., Scheringer M., Macleod M. *et al.* (2008). Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Sci. Total Environ.*; 390(2-3):396-409.

Borm P.J., Berube D. (2008). A tale of opportunities, uncertainties, and risks. *Nano Today*; 3(1-2):56-9.

Borm P.J., Schins R.P., Albrecht C. (2004). Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. *Int. J. Cancer*; 110(1):3-14.

Bradford A., Handy R.D., Readman J.W. *et al.* (2009). Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. *Environ. Sci. Technol.*; 43(12):4530-6.

Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J. *et al.* (2005). In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.*; 88(2):412-9.

Brett D.W. (2006). A discussion of silver as an antimicrobial agent: alleviating the confusion. *Ostomy Wound Manage.*; 52(1):34-41.

Brezova V., Gabcova S., Dvoranova D. *et al.* (2005). Reactive oxygen species produced upon photoexcitation of sunscreens containing titanium dioxide (an EPR study). *J. Photochem. Photobiol. B*; 79(2):121-34.

Burleson D.J., Driessen M.D., Penn R.L. (2004). On the characterization of environmental nanoparticles. *J. Environ. Sci. Health A*; 39(10):2707-53.

Carlson C., Hussain S.M., Schrand A.M. *et al.* (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B*; 112(43):13608-19.

Cha K., Hong H.W., Choi Y.G. *et al.* (2008). Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol. Lett.*; 30(11):1893-9.

Chae Y.J., Pham C.H., Lee J. *et al.* (2009). Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.*; 94(4):320-7.

Chen H.W., Su S.F., Chien C.T. *et al.* (2006). Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *FASEB J.*; 20(13):2393-5.

Chen M., von Mikecz A. (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp. Cell Res.*; 305(1):51-62.

Chen X., Schluesener H.J. (2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.*; 176(1):1-12.

Chisholm J. (1999). Respirable Dust and Respirable Silica Concentrations from Construction Activities. *Indoor Built Environ.*; 8(2):94-106.

Cho M., Cho W.W., Choi M. *et al.* (2009). The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicol. Lett.*; 189(3):177-83.

Choi O., Deng K.K., Kim N.J. *et al.* (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.*; 42(12):3066-74.

Chopra I. (2007). The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J. Antimicrob. Chemother.*; 59(4):587-90.

CPP. (2006). Nanotechnologies, nanoparticules : quels dangers ? Quels risques ? Paris : MEDD. 64 p.

de Jalon E.G., Blanco-Preto M.J., Ygartua P. *et al.* (2001). PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *Int J Pharm*; 226(1-2):181-4.

DEFRA. (2009). Report on Nanosilver. London: DEFRA.

Degussa. (1992a). The acute toxicity of Aerosil 200 to *Brachydanio rerio* (OECD Guideline No. 203, 96 h). Unpublished report IMW-R 92/007.

Degussa. (1992b). The acute toxicity of Aerosil 200 to *Daphnia magna* (OECD Guideline No. 202, 24 h). Unpublished report IMW-R 92/006.

Degussa. (1992c). The acute toxicity of Aerosil R974 to *Daphnia magna* (OECD Guideline no. 202, 24 h). Unpublished report IMW-R 92/027.

Degussa. (1999). Study on the toxicity towards algae of Aerosil R972 according to OECD test guideline 201 (alga, growth inhibition test) in the version dated 06-07-84. Unpublished report.

Drake P.L., Hazelwood K.J. (2005). Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. *Ann. Occup. Hyg.*; 49(7):575-85.

Dupont, Environmental Defense. (2007). Nano Risk Framework. 100 p.

ECETOC. (2006). JACC51: Synthetic Amorphous Silica. Brussels: ECETOC.

- Eurostaf. (2007). Les perspectives du marché français des produits solaires. Paris: Eurostaf. 170 p.
- Federici G., Shaw B.J., Handy R.D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.*; 84(4):415-30.
- Ferin J., Oberdörster G., Penney D.P. (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*; 6(5):535-42.
- Filon F.L., D'Agostin F., Crosera M. *et al.* (2007). [In vitro percutaneous absorption of silver nanoparticles]. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.*; 29(3 Suppl):451-2.
- FOPH-FOEN. (2008). La grille de précaution pour les nanomatériaux synthétiques.
- Franz T.J. (1975). Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.*; 64(3):190-5.
- FSAI. (2008). The relevance for food safety of applications of nanotechnology in the food and feed industries. Dublin: FSAI. 81 p.
- Fujishima A., Hashimoto K., Watanabe T. (1999). *TiO₂ Photocatalysis: Fundamentals and Applications*. Tokyo: BKC. 176 p.
- Geranio L., Heuberger M., Nowack B. (2009). The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing. *Environ. Sci. Technol.*; 43(21):8113-8.
- Gerashchenko B.I., Gerashchenko I.I., Kosaka T. *et al.* (2002). Stimulatory effect of aerosil on algal growth. *Can. J. Microbiol.*; 48(2):170-5.
- Goni-Urriza M., Capdepuuy M., Arpin C. *et al.* (2000). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*; 66(1):125-32.
- Gonzalez L., Lison D., Kirsch-Volders M. (2008). Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology*; 2(4):252.
- Gowers S.L., Le Patourel G.N.J. (1984). Toxicity of deposits of an amorphous silica dust on different surfaces and their pick-up by *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Cuculionidae). *J. Stored Prod. Res.*; 20:25-9.
- Graf C., Vossen D.L.J., Imhof A. *et al.* (2003). A General Method To Coat Colloidal Particles with Silica. *Langmuir*; 19(17):6693-700.
- Grassian V.H., O'shaughnessy P.T., damcakova-Dodd A. *et al.* (2007). Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ. Health Perspect.*; 115(3):397-402.
- Guiot A., Golanski L., Tardif F. (2008). Measurement of nanoparticle removal by abrasion. Nanosafe08, 4-7 november 2008, Grenoble, France.
- Gurr J.R., Wang A.S., Chen C.H. *et al.* (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*; 213(1-2):66-73.
- Hansen S.F., Larsen B.H., Olsen S.I. *et al.* (2007). Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. *Nanotoxicology*; 1(3):243-50.

- Haruta M., Kobayashi T., Sano H. *et al.* (1987). Novel Gold Catalysts for the Oxidation of Carbon Monoxide at a Temperature far Below 0 °C. *Chem. Lett.*; 16(2):405-8.
- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I. *et al.* (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*; 71(7):1308-16.
- Hirano K., Nitta H., Sawada K. (2005). Effect of sonication on the photo-catalytic mineralization of some chlorinated organic compounds. *Ultrason. Sonochem.*; 12(4):271-6.
- Hoffmann M., Hotze E.M., Wiesner M.R. (2007). Reactive Oxygen Species Generation on Nanoparticulate Material. In: Wiesner M.R. , Bottero J.-Y. *Environmental Nanotechnology: Applications and Impacts of Nanomaterials*. New York: Graw Hill Publishing Co. pp. 155-203.
- Hohr D., Steinfartz Y., Schins R.P. *et al.* (2002). The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *Int. J. Hyg. Environ. Health*; 205(3):239-44.
- Hsin Y.H., Chen C.F., Huang S. *et al.* (2008). The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.*; 179(3):130-9.
- Hsu L.Y., Chein H.M. (2007). Evaluation of nanoparticle emission for TiO₂ nanopowder coating materials. In: Maynard A.D., Pui D.Y.H. *Nanotechnology and occupational health*. Springer. pp. 157-63.
- Hueglin C., Gehrig R., Baltensperger U. *et al.* (2005). Chemical characterisation of PM_{2.5}, PM₁₀ and coarse particles at urban, near-city and rural sites in Switzerland. *Atmos. Environ.*; 39(4):637-51.
- Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M. *et al.* (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*; 19(7):975-83.
- Hwang E.T., Lee J.H., Chae Y.J. *et al.* (2008). Analysis of the Toxic Mode of Action of Silver Nanoparticles Using Stress-Specific Bioluminescent Bacteria. *Small*; 4(6):746-50.
- IARC. (2006). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 93.
- Iler R.K. (1979). Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry. Wiley-Interscience. 896 p.
- INRS. (2007). Les silices amorphes. Paris: INRS. 6 p. (ED 5033).
- INRS. (2008). Les nanomatériaux: définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention. Paris: INRS. 28 p. (Brochure ED6050).
- IRSST. (2008). Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules. 2ème édition. Montréal: IRSST. 120 p. (Etudes et Recherches, R-558)
- ISO 14040. (2006a). Management environnemental - Analyse du cycle de vie - Principes et cadre. ISO. 20 p.
- ISO 14044. (2006b). Management environnemental - Analyse du cycle de vie - Exigences et lignes directrices. ISO. 46 p.

ISO/TS 27687. (2008). Nanotechnologies -- Terminology and definitions for nano-objects -- Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. ISO. 7 p.

Jani P.U., McCarthy D.E., Florence A.T. (1994). Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *Int. J. Pharm.*; 105(2):157-68.

Ji J.H., Jung J.H., Kim S.S. *et al.* (2007a). Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.*; 19(10):857-71.

Ji J.H., Jung J.H., Yu I.J. *et al.* (2007b). Long-Term Stability Characteristics of Metal Nanoparticle Generator Using Small Ceramic Heater for Inhalation Toxicity Studies. *Inhal. Toxicol.*; 19(9):745.

Jin Y., Kannan S., Wu M. *et al.* (2007). Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells. *Chem. Res. Toxicol.*; 20(8):1126-33.

Ju-Nam Y., Lead J.R. (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.*; 400(1-3):396-414.

Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B. *et al.* (2008). Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ. Pollut.*; 156(2):233-9.

Kato S., Mashio F. (1964). TiO₂ photocatalyzed oxidation of tetraline in liquid phase. *J. Chem. Soc. Japan (Kogyo Kagaku Zasshi)*; 67:1136-40.

Kienholz M.N. (1970). Über das Verhalten von Bakterien in hochdispenser Kieselsäure. *Pharm. Ind.*; 32:677-9.

Kim J.S., Kuk E., Yu K.N. *et al.* (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*; 3(1):95-101.

Kim S., Choi J.E., Choi J. *et al.* (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro*; 23(6):1076-84.

Kim Y.S., Kim J.S., Cho H.S. *et al.* (2008). Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. *Inhal. Toxicol.*; 20(6):575.

Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Cundari E. *et al.* (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.*; 392(1-2):19-30.

Kumar R., Münstedt H. (2005). Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials*; 26(14):2081-8.

Kumari M., Mukherjee A., Chandrasekaran N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci. Total Environ.*; 407(19):5243-6.

Lademann J., Weigmann H., Rickmeyer C. *et al.* (1999). Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*; 12(5):247-56.

Lansdown A.B.G. (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr. Probl. Dermatol.*; 33:17-34.

Larese F.F., D'Agostin F., Crosera M. *et al.* (2009). Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*; 255(1-2):33-7.

Le Bihan O., Schierholz K. (2008). Assessment of nanoparticles emission from manufactured product: feasibility study. Nanosafe08, 4-7 november 2008, Grenoble, France.

Le Bihan O., Schierholz K. (2009). Evaluation des émissions de nanoparticules à partir d'un produit fini : étude de faisabilité. Congrès Français sur les Aérosols, 14 et 15 janvier 2009, Paris, France.

Le Patourel G.N., Shawir M., Moustafa F.I. (1989). Accumulation of mineral dusts from wheat by *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.*; 25(2):65-72.

Le Patourel G.N., Zhou J.J. (1990). Action of Amorphous Silica Dusts on the German Cockroach *Blattella Germanica* (Linnaeus) (Orthoptera: Blattidae). *Bull. Entomol. Res.*; 80(01):11-7.

Lead J.R., Wilkinson K.J. (2006). Aquatic Colloids and Nanoparticles: Current Knowledge and Future Trends. *Environ. Chem.*; 3(3):159-71.

Lee S.W., Kim S.M., Choi J. (2009). Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*; 28(1):86-91.

Li H., Zhang M.h., Ou J.p. (2006). Abrasion resistance of concrete containing nano-particles for pavement. *Wear*; 260(11-12):1262-6.

Limbach L.K., Wick P., Manser P. *et al.* (2007). Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ. Sci. Technol.*; 41(11):4158-63.

Lin W., Huang Y.W., Zhou X.D. *et al.* (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 217(3):252-9.

Linch K.D. (2002). Respirable concrete dust--silicosis hazard in the construction industry. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*; 17(3):209-21.

Lindgren Å. (1996). Asphalt wear and pollution transport. *Sci. Total Environ.*; 189-190:281-6.

Linnainmaa K., Kivipensas P., Vainio H. (1997). Toxicity and cytogenetic studies of ultrafine titanium dioxide in cultured rat liver epithelial cells. *Toxicol. in Vitro*; 11(4):329-35.

Linsebigler L., Lu G., Yates J.T. (1995). Photocatalysis on TiO₂ Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results. *Chem. Rev.*; 95:735-58.

Lok C.N., Ho C.M., Chen R. *et al.* (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem.*; 12(4):527-34.

Long T.C., Saleh N., Tilton R.D. *et al.* (2006). Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ. Sci. Technol.*; 40(14):4346-52.

Lucarelli M., Gatti A.M., Savarino G. *et al.* (2004). Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur. Cytokine Netw.*; 15(4):339-46.

Luetz-Meindl U., Luetz C. (2006). Analysis of element accumulation in cell wall attached and intracellular particles of snow algae by EELS and ESI. *Micron (Oxford, England: 1993)*; 37(5):452-8.

Luoma S.N. (2008). Silver Nanotechnologies and the Environment: Old Problems or New Challenges? Washington, DC: The Pew Charitable Trusts. 66 p.

Lux Research. (2005). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? New-York: Lux Research.

Maitz M.F., Pham M.T., Wieser E. *et al.* (2003). Blood compatibility of titanium oxides with various crystal structure and element doping. *J. Biomater. Appl.*; 17(4):303-19.

Matson C.W., Auffan M. (2009). Silver nanoparticle behavior and fish embryotoxicity across a salinity gradient: *International Conference on the Environmental Implications of NanoTechnology* CEINT.

Menzel F., Reinert T., Vogt J. *et al.* (2004). Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO₂ particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B*; 219-220:82-6.

Miao A.J., Schwehr K.A., Xu C. *et al.* (2009). The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.*; 157(11):3034-41.

Moore M.N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.*; 32(8):967-76.

Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A. *et al.* (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*; 16(10):2346-53.

Mueller N.C., Nowack B. (2008). Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ. Sci. Technol.*; 42(12):4447-53.

Mühling M., Bradford A., Readman J.W. *et al.* (2009). An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. *Marine Environ. Res.*; 68(5):278-83.

Nakagawa Y., Wakuri S., Sakamoto K. *et al.* (1997). The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat. Res.*; 394(1-3):125-32.

Navarro E., Piccapietra F., Wagner B. *et al.* (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.*; 42(23):8959-64.

Nichols J.W., Brown S., Wood C.M. *et al.* (2006). Influence of salinity and organic matter on silver accumulation in Gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Aquat. Toxicol.*; 78(3):253-61.

NIOSH. (2005). NIOSH current intelligence bulletin: Evaluation of Health Hazard and Recommendations for Occupational Exposure to Titanium Dioxide. (NIOSH Docket #100).

Nishimori H., Kondoh M., Isoda K. *et al.* (2009a). Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*; 72(3):626-9.

Nishimori H., Kondoh M., Isoda K. *et al.* (2009b). Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*; 72(3):496-501.

- Nowack B. (2009). The behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.*; 157(4):1063-4.
- Nozik J.A. (1993). Photocatalytic Purification and Treatment of Water and Air: Proceedings of the 1st International Conference on TiO₂s Photocatalytic Purification an. Amsterdam: Elsevier Science Ltd. 836 p.
- Oberdorster G., Ferin J., Lehnert B.E. (1994). Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Perspect.*; 102(Suppl. 5) :173-9.
- Oberdorster G., Maynard A., Donaldson K. *et al.* (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.*; 2:8.
- Oberdorster G., Stone V., Donaldson K. (2007). Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology*;1(1):2-25.
- OCDE. (1982). Good laboratory practice in the testing of chemicals: final report of the group of experts on good laboratory practice. OCDE. 62 p.
- OCDE. (1984a). Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Section 2, Effects on Biotic Systems. 26 p.
- OCDE. (1984b). Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Section 2, Effects on Biotic Systems. 12 p.
- OCDE. (1984c). Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Section 2, Effects on Biotic Systems. 9 p.
- OCDE. (2004). Synthetic amorphous silica and silicates. UNEP. 254 p.
- Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.*; 122(1):86-94.
- Ostling O., Johanson K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 123(1):291-8.
- Oughton D.H., Hertel-Aas T., Pellicer E. *et al.* (2008). Neutron activation of engineered nanoparticles as a tool for tracing their environmental fate and uptake in organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*; 27(9):1883-7.
- Pal S., Tak Y.K., Song J.M. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*; 73(6):1712-20.
- Park E.J., Park K. (2009). Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol. Lett.*; 184(1):18-25.
- Park M.V., Annema W., Salvati A. *et al.* (2009). In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 240(1):108-16.
- Pelizzetti E., Serpone N. (1986). Homogeneous and Heterogeneous Photocatalysis Springer. (NATO Science Series C). 752 p.

Pepe C. (2004). Doped-TiO₂/cement matrices photoactive materials. In: Kashino N.; Ohama Y. RILEM International Symposium on Environment-Conscious Materials and Systems for Sustainable Development. pp. 331-36.

Peters K., Unger R.E., Kirkpatrick C.J. *et al.* (2004). Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*; 15(4):321-5.

Pflucker F., Wendel V., Hohenberg H. *et al.* (2001). The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*; 14(Suppl. 1):92-7.

Pinheiro T., Pallon J., Alves L.C. *et al.* (2007). The influence of corneocyte structure on the interpretation of permeation profiles of nanoparticles across skin. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B*; 260(1):119-23.

Poma A., Di Giorgio M.L. (2008). Toxicogenomics to improve comprehension of the mechanisms underlying responses of in vitro and in vivo systems to nanomaterials: a review. *Curr. Genomics*; 9(8):571-85.

Ranade M.R., Navrotsky A., Zhang H.Z. *et al.* (2002). Energetics of nanocrystalline TiO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 99(Suppl. 2):6476-81.

Raveendran P., Fu J., Wallen S.L. (2003). Completely "Green" Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*; 125(46):13940-1.

Reijnders L. (2008). Hazard reduction for the application of titania nanoparticles in environmental technology. *J. Hazard. Mater.*; 152(1):440-5.

Renwick L.C., Donaldson K., Clouter A. (2001). Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 172(2):119-27.

Riediker M., Williams R., Devlin R. *et al.* (2003). Exposure to particulate matter, volatile organic compounds, and other air pollutants inside patrol cars. *Environ. Sci. Technol.*; 37(10):2084-93.

RIVM. (2009). Exposure to nanomaterials in consumer products. Bilthoven: RIVM. 46 p. (RIVM 340370001).

Roh J.Y., Sim S.J., Yi J. *et al.* (2009). Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on the Soil Nematode *Caenorhabditis elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics. *Environ. Sci. Technol.*; 43(10):3933-40.

Rouse J.G., Yang J., Ryman-Rasmussen J.P. *et al.* (2007). Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano Lett.*; 7(1):155-60.

Sayes C.M., Wahi R., Kurian P.A. *et al.* (2006). Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.*; 92(1):174-85.

Schins R.P.F., Knaapen A.M. (2007). Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhal. Toxicol.*; 19(Suppl. 1):189-98.

Schulz J., Hohenberg H., Pflücker F. *et al.* (2002). Distribution of sunscreens on skin. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; 54(Suppl.1):S157-S163.

- Serpone N., Pelizzetti E. (1989). Photocatalysis: Fundamentals and Applications. Wiley-Interscience. 650 p.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. *et al.* (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*; 175(1):184-91.
- Singh N., Manshian B., Jenkins G.J.S. *et al.* (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*; 30(23-24):3891-914.
- So S.J., Jang I.S., Han C.S. (2008). Effect of micro/nano silica particle feeding for mice. *J. Nanosci. Nanotechnol.*; 8(10):5367-71.
- Su H.L., Chou C.C., Hung D.J. *et al.* (2009). The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. *Biomaterials*; 30(30):5979-87.
- Sunada K., Watanabe T., Hashimoto K. (2003). Bactericidal Activity of Copper-Deposited TiO₂ Thin Film under Weak UV Light Illumination. *Environ. Sci. Technol.*; 37(20):4785-9.
- Sung J.H., Ji J.H., Park J.D. *et al.* (2009). Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles. *Toxicol. Sci.*; 108(2):452-61.
- Sung J.H., Ji J.H., Yoon J.U. *et al.* (2008). Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal. Toxicol.*; 20(6):567-74.
- Theogaraj E., Riley S., Hughes L. *et al.* (2007). An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles. *Mutat. Res.*; 634(1-2):205-19.
- Tiede K., Hassellöv M., Breitbarth E. *et al.* (2009). Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *J. Chromatogr. A*; 1216(3):503-9.
- Tinkle S.S., Antonini J.M., Rich B.A. *et al.* (2003). Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ. Health Perspect.*; 111(9):1202-8.
- Trop M. (2006). Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J. Trauma*; 61(4):1024.
- US EPA. (2008). Nanoscale Materials Stewardship Program (NMSP) Voluntary Submittal Package for Synthetic Amorphous Silica. Washington, D.C.: US EPA.
- US EPA. (2000). Exposure Factors Handbook (Final Report). Washington, D.C.: US EPA. (EPA/600/P-95/002F a-c).
- Van Hoecke K., De Schamphelaere K.A.C., Van der Meeren P. *et al.* (2008). Ecotoxicity of silica nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: importance of surface area. *Environ. Toxicol. Chem.*; 27(9):1948-57.
- Vega-Villa K.R., Takemoto J.K., Yáñez J.A. *et al.* (2008). Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; 60(8):929-38.
- Vlachou E., Chipp E., Shale E. *et al.* (2007). The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption. *Burns*; 33(8):979-85.
- Vorbau M., Hillemann L., Stintz M. (2009). Method for the characterization of the abrasion induced nanoparticle release into air from surface coatings. *J. Aerosol. Sci.*; 40(3):209-17.

- Wang C.B., Zhang W.x. (1997). Synthesizing Nanoscale Iron Particles for Rapid and Complete Dechlorination of TCE and PCBs. *Environ. Sci. Technol.*; 31(7):2154-6.
- Wang F., Gao F., Lan M. *et al.* (2009). Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicol. in Vitro*; 23(5):808-15.
- Wang J.J., Sanderson B.J., Wang H. (2007). Cytotoxicity and genotoxicity of ultrafine crystalline SiO₂ particulate in cultured human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*; 48(2):151-7.
- Warheit D.B., Webb T.R., Colvin V.L. *et al.* (2007a). Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol. Sci*; 95(1):270-80.
- Warheit D.B., Webb T.R., Reed K.L. *et al.* (2007b). Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology*; 230(1):90-104.
- Warheit D.B., Webb T.R., Sayes C.M. *et al.* (2006). Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol. Sci.*; 91(1):227-36.
- Waters K.M., Masiello L.M., Zangar R.C. *et al.* (2009). Macrophage responses to silica nanoparticles are highly conserved across particle sizes. *Toxicol. Sci.*; 107(2):553-69.
- Wiench K., Wohlleben W., Hisgen V. *et al.* (2009). Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere*; 76(10):1356-65.
- Wijnhoven S.W.P., Peijnenburg W.J.G.M., Herberts C.A. *et al.* (2009). Nano-silver a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*; 3(2):109.
- Wright M.S., Peltier G.L., Stepanauskas R. *et al.* (2006). Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. *FEMS Microbiol. Ecol.*; 58(2):293-302.
- Wu J., Liu W., Xue C. *et al.* (2009). Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol. Lett.*; 191(1):1-8.
- Yoon K.Y., Hoon Byeon J., Park J.H. *et al.* (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci. Total Environ.*; 373(2-3):572-5.
- Zhang H., Banfield J.F. (2000). Understanding Polymorphic Phase Transformation Behavior during Growth of Nanocrystalline Aggregates: Insights from TiO₂. *J. Phys. Chem. B*; 104(15):3481-7.
- Zheng L., Hong F., Lu S. *et al.* (2005). Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biol. Trace Elem. Res.*; 104(1):83-92.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



Ministère de la santé, de la
jeunesse, des sports et de la vie
associative

Ministère de l'écologie, de
l'énergie, du développement
durable et de l'aménagement du
territoire

Ministère du travail, des
relations sociales, de la famille
et de la solidarité

Direction générale de la santé

Direction de la prévention des
pollutions et des risques

Direction générale du travail

Paris le **5 JUIN 2008**

080354

Le Directeur général de la santé
Le Directeur de la prévention des
pollutions et des risques
Le Directeur général du travail

à

Monsieur Henri Poinsignon
Directeur général par intérim de l'Agence
Française de Sécurité Sanitaire de
l'Environnement et du Travail
253 Avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort

Objet : Saisine de l'Afsset n° 704bis du 02 mars 2007 relative à l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et l'environnement
Saisine de l'Afsset n° 060628 du 29 juin 2006 relative aux nanomatériaux et à la sécurité au travail

Ref : Réponse de l'Afsset n° 958 du 19 juin 2007

Copie : Afssa, Afssaps, Invs

Par courrier en date du 29 juin 2006, l'Afsset a été chargée de réaliser une expertise sur les nanomatériaux manufacturés et la santé au travail. Dans l'attente de l'achèvement de votre rapport initialement prévu pour fin 2007, nous vous serions gré de nous faire parvenir une note précisant l'état d'avancement de vos travaux et comportant une date de remise de votre rapport.

Par courrier en date du 2 mars 2007, l'Afsset a été chargée d'évaluer les risques liés aux nanomatériaux manufacturés pour la population générale et pour l'environnement. Votre courrier du 19 juin 2007 nous informe de vos difficultés à engager cette saisine dans ses objectifs actuels en raison de son dimensionnement trop étendu et du programme de travail actuel de l'Afsset.

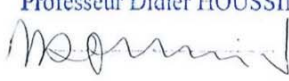
Suite à la réunion interservices de recadrage de cette dernière saisine organisée par nos services qui s'est tenue le 29 septembre 2007, il a été convenu de circonscrire le champ de votre expertise.

Dans ce contexte, nous vous proposons de vous en tenir aux propositions que vous mentionnez dans votre rapport 2006 « Les nanomatériaux, effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement », en page 183, à savoir une approche qualitative simplifiée des risques pour la santé et l'environnement présentés par les nanomatériaux manufacturés. Cette approche mériterait selon vous « d'être approfondie en l'absence d'autres outils d'évaluation disponibles et appropriés à court terme ».

En conséquence, pour répondre au mieux aux priorités de l'action publique, nous vous demandons d'étudier des scénarios d'exposition à quelques nanomatériaux manufacturés à partir d'un échantillon de produits mis sur le marché contenant ceux qui sont les plus utilisés et prenant en compte les différentes voies d'exposition et les risques potentiels pour la population générale. En ce qui concerne les nanomatériaux, cette analyse pourrait porter en particulier sur le carbone (nanotubes et fullerènes), l'argent, la silice, l'oxyde de titane, l'oxyde de zinc et l'oxyde de cérium (cf. inventaire 2006 ci-joint provenant du site [www.nanotechproject.org /consumerproducts/](http://www.nanotechproject.org/consumerproducts/)). Il vous appartient dans ce cadre de nous faire des propositions après avoir choisi les produits et les utilisations les plus pertinentes afin d'analyser les modalités d'exposition prépondérantes de la population générale.

Nous vous invitons à prendre en compte les travaux réalisés par les autres agences et de nous préciser les partenariats que vous engagerez pour atteindre cet objectif.

Nous vous demandons au vu de ces nouveaux éléments de nous communiquer avant la fin du mois de juin 2008, une note méthodologique accompagnée d'un calendrier de mise en œuvre en vue d'une remise de rapport au plus tard à la fin du deuxième trimestre 2009.

Professeur Didier HOUSSIN

Le Directeur général
de la santé

Le directeur adjoint de la prévention
des pollutions et des risques

Le Directeur adjoint de la prévention
des pollutions et des risques


Le Directeur général
du travail

VIII.2.2.4 Voie parentérale

Compte tenu des usages thérapeutiques attendus des nanomatériaux, les expositions par voies intra-veineuse ou intra-musculaire sont également à considérer et à ne pas négliger (Royal Society, 2004).

Type de produit	Emission ou source d'exposition	Population exposée	Voie d'exposition potentielle
Crème solaire contenant des matériaux à l'échelle nanométrique	Application de produit par le consommateur sur la peau	Consommateur	Cutanée
	Emission par le consommateur (par exemple nettoyage avec du savon et de l'eau) vers les réserves d'eau	Population générale	Ingestion
	Destruction des tubes de crème solaire (avec un résidu de crème solaire) après utilisation (dans des centres d'enfouissement de déchets ou par incinération)	Population générale	Ingestion ou inhalation
Catalyseurs métalliques dans l'essence pour réduire les gaz d'échappement des véhicules	Emission des gaz d'échappement des véhicules dans l'air (puis déposition sur la surface de l'eau)	Population générale	Inhalation ou ingestion

* Les catalyseurs métalliques ne sont pas utilisés actuellement dans l'essence aux USA.

Tableau VIII-6 : Exemples de sources potentielles d'exposition pour la population générale et/ou les consommateurs pour plusieurs types de produits (U.S-EPA, 2005)

VIII.2.3 Quantification des expositions de la population générale et des risques sanitaires associés

Comme déjà évoqué précédemment, la métrologie des expositions reste à développer au regard des spécificités des nanomatériaux (mesure d'autres indicateurs comme la surface spécifique ou le nombre, plutôt que la masse).

Oberdörster et coll. suggèrent également le recours aux biomarqueurs d'exposition ou d'effet (biomarqueurs d'inflammation pulmonaire ou de stress oxydatif). Le biomonitoring est également une piste pour la caractérisation des expositions identifiée par la Commission européenne et par l'US-EPA. Il présente l'avantage de pouvoir s'affranchir des problèmes métrologiques et d'englober toutes les expositions. Il permettrait à terme d'étudier les distributions spatiales et temporelles des expositions aux nanomatériaux dans la population générale. L'inventaire des nanomatériaux sur le marché, ainsi que la connaissance de leur devenir dans l'environnement et dans le corps humain restent néanmoins un préalable pour définir la faisabilité du biomonitoring et en prioriser les besoins (US-EPA, 2005).

Enfin, l'US-EPA évoque la possibilité d'utiliser des modèles mathématiques d'exposition comme HAPEM (*Hazardous Air Pollutant Exposure Model*), ChemSTEER (*Chemical Screening Tool for Exposures and Environmental Releases*) et E-FAST (*Exposure and Fate Assessment Screening Tool*) (US-EPA, 2005). L'adéquation de ces modèles aux spécificités des nanomatériaux reste néanmoins encore à étudier. En outre, comme pour le biomonitoring,

des données qualitatives et quantitatives sur les nanomatériaux susceptibles d'exposer les populations sont indispensables pour mettre en œuvre ces modèles.

Il n'a pas été trouvé dans la littérature d'évaluation des risques sanitaires au sens strict de la démarche. Une approche qualitative simplifiée des risques pour la santé et l'environnement présentés par les nanoparticules manufacturées a été proposée en juin 2005 par Lux Research, cabinet de consultants new-yorkais spécialisé dans le secteur des nanotechnologies (Lux Research, 2005). L'approche appliquée à dix types de nanomatériaux (nanotubes de carbone, oxyde de zinc, dioxyde de titane, etc.) permet d'obtenir de manière plus ou moins subjective :

- un niveau de potentiel de danger (fort, moyen ou faible). A partir d'une pondération entre différentes questions telles que « évidence de toxicité ? », « biodégradabilité ? », etc. pour lesquelles trois réponses sont possibles (oui, peut-être et non), un avis global est donné par type de nanoparticules ;
- un niveau de potentiel d'exposition (fort, moyen ou faible) lors de la fabrication, de l'utilisation et de la fin de vie du produit manufacturé, de la même façon à partir de l'attribution de scores en réponse à des questions simples (oui, peut-être et non). Pour chaque question, un poids (en pourcentage) est attribué à la contribution de chaque étape du cycle de vie.

Le croisement de ces deux échelles qualitatives d'appréciation des dangers et des expositions permet d'identifier les scénarios à risque suivant les nanoparticules et le domaine du produit manufacturé. Cette approche, bien que très subjective *a priori*, est néanmoins intéressante dans sa démarche et mériterait d'être approfondie en l'absence d'autres outils d'évaluation disponibles et appropriés à court terme.

VIII.2.4 Valeurs limites d'exposition

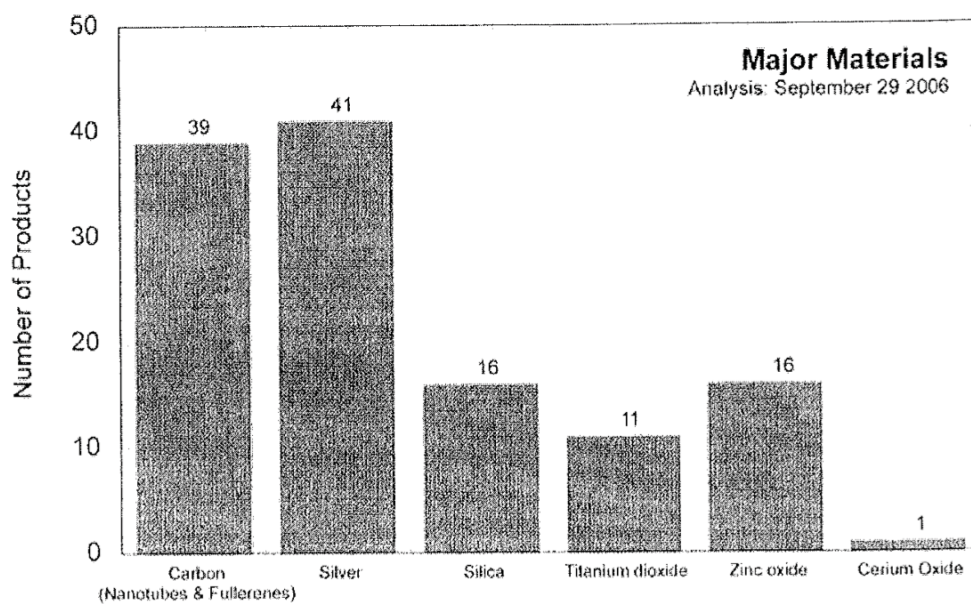
Il n'existe pas de valeurs limites d'exposition de la population générale quel que soit le milieu considéré (air, eau, aliments, etc.).

VIII.2.5 Études épidémiologiques

Il n'a pas été trouvé d'études épidémiologiques en population générale dans la littérature scientifique.

VIII.2.6 Conclusion

On retient qu'il existe à ce jour très peu de données sur les potentiels d'exposition de la population générale et aucune sur les risques sanitaires corrélés. Du fait de la diversité des développements possibles et des utilisations attendues des nanomatériaux, aucune étude n'a été conduite spécifiquement pour un type d'exposition apparu comme étant prédominant. Il n'est pas non plus possible, en l'état actuel des connaissances, de privilégier une unique voie d'exposition de la population générale : toutes sont à considérer (inhalation, ingestion et contact cutané).



Nanotechnology Consumer Products Inventory www.nanotechproject.org/consumerproducts/

© 2006 All rights Reserved By Woodrow Wilson International Center for Scholars

Annexe 2 : Document support aux auditions

Document de préparation aux auditions

Nom du produit :

1. Présentation et contexte

1.1. Mission de l'Afsset

L'Afsset a été saisie le 05 juin 2008 par la Direction générale de la santé, la Direction générale de la prévention des risques et la Direction générale du travail pour élaborer et étudier des scénarios d'exposition de la population générale à quelques nanomatériaux manufacturés contenus dans un échantillon de produits mis sur le marché, en prenant en compte les différentes voies d'exposition et les risques potentiels pour la population générale.

Concernant le traitement de cette saisine, l'Afsset, dans un premier temps et, conformément à la demande de ses tutelles, a sélectionné un panel de produits mis sur le marché et comportant des nanomatériaux manufacturés les plus utilisés. Dans un second temps, il appartient à l'Agence d'élaborer pour ces produits des scénarios d'exposition qui tiennent compte des voies d'exposition ainsi que des risques potentiels pour la population générale.

La partie production de nano-objets et protection des travailleurs est un volet qui a été étudié dans la saisine précédemment confiée à l'Afsset : « Nanomatériaux et sécurité au travail ». Aujourd'hui les efforts se tournent vers la population générale et l'environnement.

Dans ce cadre l'Afsset souhaite se rapprocher à la fois :

- des principaux producteurs afin de connaître au mieux les caractéristiques du nanomatériau incorporé,
- des importateurs (de nanomatériaux ou nano composants),
- de certains intégrateurs/ transformateurs/ distributeurs afin de pouvoir élaborer des scénarios dans des cas précis en connaissant également au mieux les caractéristiques du nanomatériau entrant ainsi que du sortant.

Nous rappelons que l'Afsset s'engage à respecter la confidentialité de l'ensemble des informations qui lui seront fournies dans le cadre de cette étude. Cependant, nous vous informons que l'Afsset dispose du droit d'accès à tous renseignements utiles dans le cadre de l'exercice de ses missions (article L.1336-1 du code de la santé publique⁵⁸).

1.2. Utilisation du document

Dans le contexte présenté ci-dessus, ce document a pour ambition de servir de support de préparation d'audition. Remis au représentant de l'organisme auditionné, il résume les principales interrogations de l'Afsset.

La finalité de ce document support est donc de permettre au représentant auditionné de mieux cerner les attentes de l'Afsset, d'anticiper les demandes qui seront formulées au cours de l'audition et de rassembler les données à sa disposition qui lui sembleront nécessaires pour y répondre de la manière la plus satisfaisante possible.

⁵⁸ « L'agence accède, à sa demande et dans des conditions préservant la confidentialité des données à l'égard des tiers, aux informations nécessaires à l'exercice de ses missions et détenues par toute personne physique ou morale sans que puisse lui être opposé le secret médical ou le secret en matière commerciale et industrielle ».

Ces attentes vis-à-vis des multiples parties prenantes étant différentes en fonction de leurs implications au sein de la chaîne de production de produits contenant des nanomatériaux, le document compartimente les interrogations de l'Afsset suivant la catégorisation suivante :

- Les producteurs de nanomatériaux ;
- Les clients utilisateurs/transformateurs de nanomatériaux (produit intermédiaire) pour l'élaboration d'un produit fini.

L'auditionné doit ainsi en premier lieu se positionner et définir son rôle (producteur / importateur / client / transformateur) afin de se référer aux parties concernant son activité.

Dans un souci d'homogénéité entre les différentes instances travaillant sur ces aspects, un certain nombre de définitions préalables sont rappelées dans le paragraphe suivant (§ 1.3).

1.3. Définitions

Reprenons le chapitre 2 du règlement (CE) n°1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), Article 3, Définitions :

- **«substance»** : un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour en préserver la stabilité et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant qui peut être séparé sans affecter la stabilité de la substance ou modifier sa composition ;
- **«préparation»** : un mélange ou une solution composés de deux substances ou plus ;
- **«article»**: un objet auquel sont donnés, au cours du processus de fabrication, une forme, une surface ou un dessin particuliers qui sont plus déterminants pour sa fonction que sa composition chimique ;
- **«producteur d'un article»** : toute personne physique ou morale qui fabrique ou assemble un article dans la Communauté;
- **«distributeur»**: toute personne physique ou morale établie dans la Communauté, y compris un détaillant, qui n'exécute que des opérations de stockage et de mise sur le marché d'une substance, telle quelle ou contenue dans une préparation, pour des tiers ;
- **«utilisateur en aval»**: toute personne physique ou morale établie dans la Communauté, autre que le fabricant ou l'importateur, qui utilise une substance, telle quelle ou contenue dans une préparation, dans l'exercice de ses activités industrielles ou professionnelles. Un distributeur ou un consommateur n'est pas un utilisateur en aval. Un réimportateur exempté en vertu de l'article 2, paragraphe 7, point c), est considéré comme utilisateur en aval ;
- **«mise sur le marché»**: le fait de fournir un produit ou de le mettre à la disposition d'un tiers, à titre onéreux ou non. Toute importation est assimilée à une mise sur le marché.

Puis, la norme ISO/TS 27687:2008 (Nanotechnologies -- Terminologie et définitions relatives aux nano-objets -- Nanoparticule, nanofibre et nanofeuillet) :

- **« échelle nano »** : structures élémentaires dont au moins une des dimensions varie entre 1 et 100 nanomètres (nm) ;
- **« nano-objet »** : matériau avec une, deux ou trois dimensions « externes » à l'échelle nanométrique.

2. Informations recherchées

A. Les producteurs/importateurs

A.1 Les entrants

A.1.1 Caractérisation

- Quel est (sont) le(s) type(s) de nanomatériau(x) que vous utilisez : métalliques, céramiques, semi conducteurs, et organiques ?
- Quelle est la composition ? (composition chimique et structure) ?
- Sous quelle forme se présentent ces nano-objets dans la formulation de vos produits: particules isolées, agrégats, agglomérats, nano fibres, nano fils, films, massif (nano composite, organique, poudre nanostructurée, poudre micronique) ? Quel est l'état d'agglomération, d'agrégation ?
- Quelles sont les degrés de pureté et les impuretés identifiées?
- Quelles sont les caractéristiques de tailles pour la partie nanostructurée et les agglomérats/agrégats? (tailles moyennes et distribution)
- Quelles sont les caractéristiques de solubilité ? (milieu aqueux et organiques)
- Quelles sont les caractéristiques de densité ?
- Quelles sont les caractéristiques de porosité ?
- Quelles sont les propriétés de stabilité ?
- Quelle est la surface spécifique ?
- Quelle est la physico - chimie de surface ? (présence d'un revêtement de surface ?)
- Quelle est la charge de surface ?
- Des données toxicologiques et écotoxicologiques pertinentes (Koc, études propres au produit, relatives à des produits similaires, ...) sont-elles disponibles ?
- Y a-t-il d'autres indicateurs de réactivité connus ? (réactivité acido basique, photocatalytique, redox, formation radicalaire, ...)
- Quelles sont les autres informations qui vous paraissent pertinentes ?

A.1.2 Production

- Quelle est la voie de synthèse des nanomatériaux ? La méthode est-elle brevetée ?
- Quel est le conditionnement de votre nanomatériau (poudre en vrac, solution...)?
- Quelle est sa stabilité ?

A.2 Les sortants

- Quelles caractérisations (fiche de données de sécurité) sont fournies avec les nanomatériaux aux utilisateurs ?
- Des recommandations d'utilisations sont-elles fournies ?
- Quelles sont les utilisations prévues / la catégorie d'utilisateurs ?
- Quels sont les utilisateurs prévus ? (industrie - préciser lesquelles / bricoleurs / particuliers / ... ?)
- Quelles sont les conditions de livraison ? (le produit est-il traité comme un produit dangereux ?)

B. Les utilisateurs/ transformateurs/ distributeurs

B.1 Les entrants

- Quel est (sont) le(s) type(s) nanomatériau(x) que vous utilisez pour l'application visée : métalliques, céramiques, semi conducteurs, et organiques ?
- Quelle est la composition ? (composition chimique et structure) ?
- Quelles caractérisations sont fournies par le producteur (Une Fiche de données de sécurité est-elle disponible) ? Mentionnent-elles l'aspect nano ? Sont-elles suffisantes et adaptées à la spécificité nano ? Une batterie de tests est-elle effectuée sur les entrants avant utilisation ?
- Quelles sont les principales propriétés attendues des nanomatériaux incorporés dans vos articles ?
- Utilisez-vous d'autres nanomatériaux pour d'autres applications ? si oui, précisez.

B.2 Les sortants

- Quelle est l'application visée ?
- Utilisez vous ce même nanomatériau pour différentes applications, si oui précisez.
- Quelles sont les principales étapes de votre processus d'incorporation ainsi que les principaux paramètres de production (quantité de nanomatériaux, concentrations, rendement,..) ?

B.2.1 Caractérisation

- Quelles sont les caractérisations des produits finis (articles)? Tiennent-elles compte des nanomatériaux incorporés ?
- Quelle est la composition de l'article ?
- Quelle est la teneur en nano ?

Analyse du cycle de vie depuis la sortie d'usine :

- Existe-t-il des études de vieillissement spécifiques à l'article contenant des nanomatériaux ? si non, existe-t-il un futur programme d'étude sur le sujet ?
- Avez-vous effectué des études de comportement de l'article contenant des nanomatériaux ? (Dispersion, émissivité et relargage prévisibles de nanomatériaux issus du produit) Si non, un programme d'étude est-il envisagé à ce sujet ?
- Les aspects écotoxicologiques sont-ils pris en compte ou feront-ils l'objet d'études futures ? Dans l'affirmative quelles sont les études effectuées ainsi que les paramètres pris en compte ?

B.2.2 Mise sur le marché

- Quelles sont les catégories de consommateurs visées ?
- Quelles sont les utilisations prévues ? (fréquence, durée / taux de pénétration dans la population, méthodes de conservation par le consommateur, ...).
- Existe-t-il des recommandations d'utilisation pour le produit ?
- Existe-t-il des dispositifs de recyclage, récupération des produits en fin de vie ou durant l'utilisation ?
-

Annexe 3 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine

RAPPEL DES RUBRIQUES DE LA DECLARATION PUBLIQUE D'INTERETS

IP-A	Interventions ponctuelles : autres
IP-AC	Interventions ponctuelles : activités de conseil
IP-CC	Interventions ponctuelles : conférences, colloques, actions de formation
IP-RE	Interventions ponctuelles : rapports d'expertise
IP-SC	Interventions ponctuelles : travaux scientifiques, essais, etc.
LD	Liens durables ou permanents (Contrat de travail, rémunération régulière ...)
PF	Participation financière dans le capital d'une entreprise
SR	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Parents salariés dans des entreprises visées précédemment)
SR-A	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Participation à conseils d'administration, scientifiques d'une firme, société ou organisme professionnel)
VB	Activités donnant lieu à un versement au budget d'un organisme

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU CES PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

NOM	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt <i>en cas de lien déclaré</i>	Date de déclaration des intérêts
Analyse Afsset :		
ANFOSSO-LÉDÉE	Fabienne Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	13 mai 2008
BÉRENGIER	Michel Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	07 mai 2008 23 octobre 2009
CÉSARINI	Jean-Pierre IP-SC Investigateur principal pour Oenobiol (Rémunération	15 mai 2008 09 mars 2009 02 novembre 2009

	personnelle) (2006-2007) SR-A Membre du Conseil scientifique de l'association Sécurité solaire depuis 1997 Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
COHEN	Jean-Claude	06 mai 2008 26 octobre 2009
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
COURANT	Daniel	28 avril 2008 03 novembre 2009
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
COUTURIER	Frédéric	15 mai 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
DEBOUZY	Jean-Claude	06 mai 2008 24 octobre 2009
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
DORÉ	Jean-François	29 avril 2008 11 mai 2009
Analyse Afsset :	IP-CC Conférence de presse sur « La protection solaire : le bon usage du soleil » pour NIVEA (Rémunération personnelle) (31/01/2005) Conférences sur « les ingrédients solaires et le vieillissement. Soleil UV et peau » pour la Société française des antioxydants (Aucune rémunération) (25/05/2005 et 10/12/2007) SR-A Membre du Conseil scientifique de l'association Sécurité solaire depuis 1997 Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
EL KHATIB	Aïcha	30 avril 2008 20 novembre 2009
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
FLAHAUT	Emmanuel	29 avril 2008 17 juillet 2008

23 octobre 2009

IP-RE

Expert du groupe « Effets des nanoparticules et nanomatériaux sur la santé et l'environnement » de l'OMNT (Observatoire des micro et nanotechnologies) (Aucune rémunération) (depuis 2007)

VB

Thèse sur les interconnexions à base de nanotubes de carbone financée par Intel Ireland donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université Paul Sabatier)

Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine

Analyse Afsset :**GAFFET Éric**

23 juin 2008

11 août 2008

06 novembre 2008

04 novembre 2009

IP-RE

Expertises de programme de recherche (Nano) pour différents établissements: PCRD-Programme NMP pour la DGXII (Europe) (2003, 2004 et 2005), l'International Copper Association (ICA) and the University of Chile, through the Center for Advanced Interdisciplinary Research in Materials (CIMAT), le Belgian Federal Public Planning Service /Science Policy, l'Australian Research Council, l'ANR et l'ANRT (2000-2008)

DG XII : Expertises 7ème PCRD - NMP-2008-SMALL-1.3-2 (NMP-2008-1.3-2 : Impact of engineered nanoparticles on health and the environment") et NMP-2008-1.3-1 "Validation, adaptation and/or development of risk assessment methodology for engineered nano-particles (Rémunération personnelle)

Expert Programme Blanc - Programme Matériaux Fonctionnels et Procédés Innovants - Programme Contaminants - Ecosystèmes et Santé pour l'ANR (Agence nationale de la recherche) (Aucune rémunération) (2008)

Expert français auprès de la Commission européenne : RIP - oN 1 : «Reach Implementation program on Nanomaterials» (Aucune rémunération) (2009-2012)

Expertise du Programme national Belge « NanoToxico » (Rémunération personnelle)

Expertise OSEO du Programme Genesis (Rémunération personnelle)

IP-AC

Membre de comités de pilotage et de groupes de

travail sur les nanomatériaux pour l'AFNOR (2005-2007), ECRIN (2005-2007), la Fédération Française de la Chimie (2006-2007)

Expertise ponctuelle pour l'Agence de l'Innovation Industrielle (A2i) (2007)

Veille technologique « Nanomatériaux » pour CEIS-Innovation 128 (2006)

Membre du Comité scientifique sectoriel de l'ANR/PNano « Nanosciences et Nanotechnologies » (Aucune rémunération) (2009-2011) et membre du Comité de Pilotage (Aucune rémunération) (2007 et 2008)

Membre du Club « Amélioration des performances humaines pour des applications de défense et de sécurité, quelles opportunités et quelles limites vis à vis des nouvelles technologies? » pour la DGA / CHEAR (Centre des Hautes Etudes de l'Armement) (Aucune rémunération) (2008-2010)

Membre du Comité de Pilotage NanoForum (CNAM-DGS) (Aucune rémunération)

Représentant français au sein de 2 GT NanoMatériaux de l'OCDE WPMN: « Développement d'une base de données de l'OCDE sur la recherche en Nanotechnologie » et « Stratégies de recherche sur la sûreté sanitaire et environnementale des nanotechnologies » (Aucune rémunération)

Membre du Comité Scientifique NanoRisks 2008 (Aucune rémunération)

Membre du Groupe d'Appui direct de la Commission Particulière Débat Public/CPDP Nanotechnologies (Rémunération personnelle) (2009-2010)

Expert/Collège Professionnel au CNC (Conseil National de la Consommation) (Aucune rémunération) (2008-2009)

Membre du Groupe de Veille sur les Impacts Sanitaires des Nanomatériaux « Nano » du HCSP (Haut Conseil Santé Publique)/DGS (Aucune rémunération) (depuis 2007)

Expert « Nanoparticules, nanomatériaux : effets sur la santé et l'environnement » de l'OMNT (Observatoire des Micro et Nano Technologies) (Aucune rémunération)

IP-CC

3 conférences sur les nanomatériaux et nanoparticules chez Saint-Gobain (1 jour en 2005), EDF (1 jour en 2005) et le Syndicat des Industries Minérales (2 jours en 2006)

Membre du Comité de Pilotage du Congrès Matériaux 2010 de la Fédération française des matériaux (Aucune rémunération)

IP-A

Président de séance au 3rd Nano Safety for Success Dialogue: Building Trust in Nanotechnologies

(Bruxelles, 3 et 4/11/2009) (Aucune rémunération)

Membre du Comité d'Organisation International à la III International Conference on Fundamental Bases of Mechanochemical Technologies (FBMT 2009)

Membre du Comité Scientifique, Président de séance au IV Symposium franco-japonais de Bioéthique et d'Ethique des Sciences (Fukuoka-Japon, 17-19/04/2009) (Aucune rémunération)

Membre International Advisory Committee INCOME 2008 (Aucune rémunération)

VB

Direction d'un laboratoire partenaire des programmes européens sur les nanomatériaux :

-STREP/NAMAMET (impliquant les entreprises TEaM et TMC), financé par la Commission européenne

-Mechanocolor (impliquant les entreprises DGTec et XAAR Jet), financé par l'ANR

Programme NANO-HP-CUIVRE » : Recherche Collaborative Le Bronze Industriel - Région Champagne Ardenne (2009-2010)

Programme ANR/PNano : NanoNorma : partenaire de ce programme pluridisciplinaire portant sur les aspects normatifs des nanomatériaux et intégrant des Juristes (SHS) et des Chimistes des Matériaux (2009-2011)

SR-A

Co-encadrement d'une thèse CIFRE pendant la 1^{ère} année et pendant la phase de préparation par Schneider Electric Industries (2004-2006)

Licence de transfert de savoir pour un broyeur planétaire permettant d'élaborer des poudres nanostructurées avec Fritsch (Allemagne) (1999-2006)

Co-auteur d'un brevet franco-américain de densification des nanomatériaux, déposé en 1999, non exploité

Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine

HOURS Martine

30 avril 2008
26 octobre 2009

Analyse Afsset : /
Aucun lien déclaré

JOB Agnès

29 avril 2008
23 novembre 2009

Analyse Afsset : /
Aucun lien déclaré

LABEYRIE Antoine

28 avril 2008

		20 novembre 2009
	<p>PF</p> <p>Actions de la SARL Irilab</p> <p>LD</p> <p>Administrateur de la société Irilab depuis 2000</p> <p>IP-SC</p> <p>Essais pour la société Irilab depuis 2000 (Aucune rémunération)</p>	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
LAMBERT Jacques		06 mai 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
LAURIER Dominique		13 mai 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
LE BIHAN Olivier		23 juin 2008 15 octobre 2009
	<p>LD</p> <p>Ingénieur études et recherche à l'INERIS (Institut National de l'environnement industriel et des risques)</p> <p>IP-SC et VB</p> <p>Projet de recherche partenariale / Usure des matériaux pour Nanoledge donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (< 3 % du budget du laboratoire) (2007)</p> <p>Étude préliminaire de mesures granulométriques de fines particules de silice dans l'air pour Rhodia donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (< 3 % du budget du laboratoire) (2005)</p> <p>Caractérisation des particules fines et ultrafines lors d'opérations de maintenance pour Saint-Gobain donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (< 3 % du budget du laboratoire) (2009)</p>	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
LEPOUTRE Philippe		25 avril 2008 27 octobre 2009
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	

MARCHAL Didier	29 avril 2008 07 janvier 2009 24 octobre 2009
LD Manager européen chez Johnson Controls Inc. depuis 1997 IP-SC Études de risques et de danger pour EHS Consultants (Rémunération personnelle) (2005-2007)	
Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
MOCH Annie	29 avril 2008 24 octobre 2009
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
PIRARD Philippe	15 mai 2008 24 novembre 2009
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
PLANTON Serge	10 juillet 2008 27 octobre 2009
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
RUMEAU Michel	02 mai 2008 20 novembre 2009
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
de SÈZE René	12 juin 2008 20 novembre 2009
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
TARDIF François	15 avril 2008 26 novembre 2008 20 novembre 2009
IP-CC « Moyens de mesure des nanoparticules » pour ECRIN (Paris, 2005) « Utilisation des Nanotraceurs » pour GFHN (Grenoble, 2006) Commission AFNOR « Nanotechnologies » (Aucune rémunération) Principaux contrats de collaboration scientifique	

Analyse Afsset :	Laboratoire CEA/ industriels : HTH, Arjowiggins, Sofileta, Alcen, Tronico, Faur Ingénierie, EDF, Andra, Areva, DebioPharm, Philips. (< 50 % du budget du labo)
	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine
VALLET Michel	24 avril 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /
VECCHIA Paolo	29 avril 2008 06 mai 2009 26 octobre 2009
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU GT PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

NOM Analyse Afsset :	Prénom Rubrique de la DPI Description de l'intérêt	Date de déclaration des intérêts
BOIZE	Magali IP-AC Participation au groupe de travail CSIC du Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la mer (Aucune rémunération) Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	25 novembre 2008 26 février 2009 04 novembre 2009
BOTTERO	Jean-Yves IP-RE Expert Programme Blanc – Programme PNano pour l'ANR (agence nationale de la recherche) (Aucune rémunération) (2008). Expertise ponctuelle pour l'Université de Vienne. (Rémunération personnelle). Expertise pour l'Université Mac Gill (Canada). (Aucune rémunération) Expertise pour l'Université de Toulouse 3 Expertises pour C-Nano Ile de France IP-AC Membre du Groupe de Veille sur les Impacts Sanitaires des Nanomatériaux « Nano » du HCSP (Haut Conseil Santé Publique)/DGS (Aucune rémunération) (depuis 2007) Expert « Nanoparticules, nanomatériaux : effets sur la santé et l'environnement » pour l'OMNT (Observatoire des Micro et Nano Technologies) (Aucune rémunération) (depuis 2007) Président du Comité d'évaluation ECOTECH de l'ANR (Aucune rémunération) Membre du Comité Sectoriel de l'ANR P3N puis P2N (Aucune rémunération) (depuis 2007)	12 décembre 2008 26 novembre 2009
	IP-CC Congrès de l'OCDE (conférence invitée) : « Nano: the hot new thing... that has been around for a while » (Paris,	

septembre 2009)

Conférence Plénière de l'EPFL (École polytechnique fédérale de Lausanne) : « Le futur des nanoparticules et leurs dangers potentiels. Nanotechnologies, potentialités et risques pour l'homme et l'environnement » (30/11/2009)

Minéralogie environnementale, colloque de l'Académie des Sciences/Institut de France : « Nanomatériaux et nanoparticules manufacturées : Perturbation de l'activité biologique en milieu environnemental » (14-15/09/ 2009)

UNSW Center for Water and Waste Technology Seminars: « Speciation of nanoparticles: Environmental and ecotoxicological implications » (Sydney-Australie, 20/11/2008)

4th SOLEIL Users Meeting : « Formation Mechanism of Nanosized Alumino-Silicate: A Multi Method Study » (Palaiseau-France, 21-22/01/2009)

237th ACS National Meeting : « Physical-chemical characterization of residues from alteration of engineered nanomaterials : Commercialized sunscreens containing titanium dioxide nanoparticles » (Salt Lake City-USA, 22-26/03/2009)

SOWACOR First Annual Assembly (conférence invitée) : « Natural and engineered nanoparticles in soils and surface waters: occurrence, benefits and risks » (Utrecht-Netherlands, 18-19/05/2009)

Journées Scientifiques C'Nano PACA (conférence plénière) : « Environmental nanotechnologies » (Porquerolles, 25-27/05/2009)

19th Annual V.M. Goldschmidt Conference (conférence invitée) : « Formation and growth mechanisms of natural nanotubes : imogolites » et « Physical-chemical characterization and ecotoxicity of residues from alteration of engineered nanomaterials » (Davos-suisse, 21-26/06/2009)

4th International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials.: « Aging of commercial nanomaterials: a new environmental challenge? » et « Mobility vs. Attachment of TiO₂ nanoparticles in a natural sandy porous media » (Vienne-Autriche, 6-9/09/2009)

Nanoparticle and particle separation 2009 : « Environmental impact of nano-Residues from the Degradation of commercialized Sunscreens : physico-chemical evolution during aging and toxicity towards living organisms from aquatic media » (Duke University, Durham-NC-USA, 3-5/06/2009)

UKY Dpt. Plant & Soil Sciences Seminar Series :« Natural and engineered nanomaterials : reactivity and ecotoxicological aspects » (Lexington KY-USA,14/09/2009)

IP-SC

« Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective ». *Nature, Nanotechnology, Vol 4 Issue 10 (2009)*

« CeO₂ nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts in vitro ». *Nanotechnology* (2009)

« Hydration and dispersion of C-60 in aqueous systems : The nature of Water-Fullerene interactions ». *Langmuir* Vol 25, 19, (2009)

« Role of natural nanoparticles on the speciation of Ni in andosols of la Reunion ». *Geochimica et cosmochimica acta* 73 (2009)

« Synthesis of unexpected large quantities of single-waled aluminogermanate nanotubes ». *Research Highlights, Materials science* (2009)

« Les membranes céramiques formées à partir de nanoparticules : technologie au service de l'environnement ». *Les Actualités Chimiques* 331 (2009)

« Synthesis of Large Quantities of Single-Walled Aluminogermanate Nanotube ». *J. AM. CHEM.SOC.* (2008)

« Synthesis of Imogolite Fibers from Decimolar Concentration at Low Temperature and Ambient Pressure: A Promising Route for Inexpensive Nanotubes ». *J. AM. CHEM. SOC.* (2009)

« Relation between the Redox State of Iron-Based Nanoparticles and Their Cytotoxicity toward *Escherichia coli* ». *Environ. Sci. Technol.* (2008)

« Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential toxicity in vitro ». *Environmental Pollution* 157 (2009)

VB

Direction du CEREGE UMR 6635 CNRS-UPC impliqué dans des projets de recherche sur les implications environnementales des nanomatériaux et nanoparticules (ANR PNANO, ANR CES, ANR PRECODD, 7th PCRD)

Direction du GDR-I ICEINT : International Consortium on Environmental Implications of Nanotechnology (depuis janvier 2009)

Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine

CHEVALIER Dany

05 novembre 2008
21 novembre 2008
29 janvier 2009
25 octobre 2009

Aucun lien déclaré

Analyse Afsset : /

GAFFET Éric (membre du CES « Évaluation des risques liés aux agents physiques, aux nouvelles technologies et aux grands aménagements »)

23 juin 2008
11 août 2008
06 novembre 2008
04 novembre 2009

IP-RE

Expertises de programme de recherche (Nano) pour différents établissements: PCRD-Programme NMP pour la DGXII

(Europe) (2003, 2004 et 2005), l'International Copper Association (ICA) and the University of Chile, through the Center for Advanced Interdisciplinary Research in Materials (CIMAT), le Belgian Federal Public Planning Service /Science Policy, l'Australian Research Council, l'ANR et l'ANRT (2000-2008)

DG XII : Expertises 7ème PCRD - NMP-2008-SMALL-1.3-2 (NMP-2008-1.3-2 : Impact of engineered nanoparticles on health and the environment") et NMP-2008-1.3-1 "Validation, adaptation and/or development of risk assessment methodology for engineered nano-particles (Rémunération personnelle)

Expert Programme Blanc - Programme Matériaux Fonctionnels et Procédés Innovants - Programme Contaminants - Ecosystèmes et Santé pour l'ANR (Agence nationale de la recherche) (Aucune rémunération) (2008)

Expert français auprès de la Commission européenne : RIP - oN 1 : «Reach Implementation program on Nanomaterials» (Aucune rémunération) (2009-2012)

Expertise du Programme national Belge « NanoToxico » (Rémunération personnelle)

Expertise OSEO du Programme Genesis (Rémunération personnelle)

IP-AC

Membre de comités de pilotage et de groupes de travail sur les nanomatériaux pour l'AFNOR (2005-2007), ECRIN (2005-2007), la Fédération Française de la Chimie (2006-2007)

Expertise ponctuelle pour l'Agence de l'Innovation Industrielle (A2i) (2007)

Veille technologique « Nanomatériaux » pour CEIS-Innovation 128 (2006)

Membre du Comité scientifique sectoriel de l'ANR/PNano « Nanosciences et Nanotechnologies » (Aucune rémunération) (2009-2011) et membre du Comité de Pilotage (Aucune rémunération) (2007 et 2008)

Membre du Club « Amélioration des performances humaines pour des applications de défense et de sécurité, quelles opportunités et quelles limites vis à vis des nouvelles technologies? » pour la DGA / CHEAR (Centre des Hautes Études de l'Armement) (Aucune rémunération) (2008-2010)

Membre du Comité de Pilotage NanoForum (CNAM-DGS) (Aucune rémunération)

Représentant français au sein de 2 GT NanoMatériaux de l'OCDE WPMN: « Développement d'une base de données de l'OCDE sur la recherche en Nanotechnologie » et « Stratégies de recherche sur la sûreté sanitaire et environnementale des nanotechnologies » (Aucune rémunération)

Membre du Comité Scientifique NanoRisks 2008 (Aucune rémunération)

Membre du Groupe d'Appui direct de la Commission Particulière Débat Public/CPDP Nanotechnologies (Rémunération personnelle) (2009-2010)

Expert/Collège Professionnel au CNC (Conseil National de la Consommation) (Aucune rémunération) (2008-2009)

Membre du Groupe de Veille sur les Impacts Sanitaires des Nanomatériaux « Nano » du HCSP (Haut Conseil Santé Publique)/DGS (Aucune rémunération) (depuis 2007)

Expert « Nanoparticules, nanomatériaux : effets sur la santé et l'environnement » de l'OMNT (Observatoire des Micro et Nano Technologies) (Aucune rémunération)

IP-CC

3 conférences sur les nanomatériaux et nanoparticules chez Saint-Gobain (1 jour en 2005), EDF (1 jour en 2005) et le Syndicat des Industries Minérales (2 jours en 2006)

Membre du Comité de Pilotage du Congrès Matériaux 2010 de la Fédération française des matériaux (Aucune rémunération)

IP-A

Président de séance au 3rd Nano Safety for Success Dialogue: Building Trust in Nanotechnologies (Bruxelles, 3 et 4/11/2009) (Aucune rémunération)

Membre du Comité d'Organisation International à la III International Conference on Fundamental Bases of Mechanochemical Technologies (FBMT 2009)

Membre du Comité Scientifique, Président de séance au IV Symposium franco-japonais de Bioéthique et d'Ethique des Sciences (Fukuoka-Japon, 17-19/04/2009) (Aucune rémunération)

Membre International Advisory Committee INCOME 2008 (Aucune rémunération)

VB

Direction d'un laboratoire partenaire des programmes européens sur les nanomatériaux :

-STREP/NAMAMET (impliquant les entreprises TEaM et TMC), financé par la Commission européenne

-Mechanocolor (impliquant les entreprises DGTec et XAAR Jet), financé par l'ANR

Programme NANO-HP-CUIVRE » : Recherche Collaborative Le Bronze Industriel - Région Champagne Ardenne (2009-2010)

Programme ANR/PNano : NanoNorma : partenaire de ce programme pluridisciplinaire portant sur les aspects normatifs des nanomatériaux et intégrant des Juristes (SHS) et des Chimistes des Matériaux (2009-2011)

SR-A

Co-encadrement d'une thèse CIFRE pendant la 1^{ère} année et pendant la phase de préparation par Schneider Electric Industries (2004-2006)

Licence de transfert de savoir pour un broyeur planétaire permettant d'élaborer des poudres nanostructurées avec

	<p>Fritsch (Allemagne) (1999-2006) Co-auteur d'un brevet franco-américain de densification des nanomatériaux, déposé en 1999, non exploité</p> <p>Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine</p>	
LE BIHAN	<p>Olivier (membre du CES « Évaluation des risques liés aux agents physiques, aux nouvelles technologies et aux grands aménagements »)</p> <p>LD</p> <p>Ingénieur études et recherche à l'INERIS (Institut National de l'environnement industriel et des risques)</p> <p>IP-SC et VB</p> <p>Projet de recherche partenariale / Usure des matériaux pour Nanoledge donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (< 3 % du budget du laboratoire) (2007)</p> <p>Étude préliminaire de mesures granulométriques de fines particules de silice dans l'air pour Rhodia donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (< 3 % du budget du laboratoire) (2005)</p> <p>Caractérisation des particules fines et ultrafines lors d'opérations de maintenance pour Saint-Gobain donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (< 3 % du budget du laboratoire) (2009)</p> <p>Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine</p>	<p>23 juin 2008 15 octobre 2009</p>
MOUNEYRAC	<p>Catherine</p> <p>IP-SC</p> <p>Participation au 7^{ème} PCRDT NMP-2007-1.3.2. Risk Assessment of engineered nanoparticles on health and the environment (2008-2012)</p> <p>IP-CC</p> <p>Auditrice promotion 2009-2010 pour l'IHEST (Institut des Hautes Études pour la Science et la Technologie-Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche) (Aucune rémunération)</p> <p>Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine</p>	<p>26 novembre 2008 13 février 2009 12 novembre 2009</p>
NESSLANY	<p>Fabrice</p> <p>VB</p> <p>Études de mutagenèse pour diverses sociétés pharmaceutiques, cosmétiques, agro-chimiques donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Institut Pasteur de Lille) (> 90 % du budget du laboratoire)</p> <p>Travaux auprès de l'Action Conjointe : expérimentations en génotoxicité sur des produits fournis par Rhodia dans le cadre d'un programme européen donnant lieu à versement à</p>	<p>14 août 2009 16 octobre 2009 27 novembre 2009</p>

	<p>l'organisme d'appartenance (< 10 % du budget du laboratoire)</p> <p>Programme régional sur la Génotoxicité des nanoparticules : « Caractérisation des propriétés physico-chimiques déterminantes et mise en place d'un modèle in vitro des voies aériennes supérieures applicable à l'étude du danger des particules issues d'un environnement urbano-industriel » (< 10 % du budget du laboratoire) (2009-2012)</p>	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
RIEDIKER Michael		28 novembre 2008 08 juillet 2009
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
TARDIF François (membre du CES « Évaluation des risques liés aux agents physiques, aux nouvelles technologies et aux grands aménagements »)		15 avril 2008 26 novembre 2008 20 novembre 2009
	<p>IP-CC</p> <p>« Moyens de mesure des nanoparticules » pour ECRIN (Paris, 2005)</p> <p>« Utilisation des Nanotraceurs » pour GFHN (Grenoble, 2006)</p> <p>Commission AFNOR « Nanotechnologies » (Aucune rémunération)</p> <p>Principaux contrats de collaboration scientifique Laboratoire CEA/ industriels : HTH, Arjowiggins, Sofileta, Alcen, Tronico, Faur Ingénierie, EDF, Andra, Areva, DebioPharm, Philips. (< 50 % du budget du labo)</p>	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	

**SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES EXPERTS RAPPORTEURS POUR LE
GT PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE**

NOM Analyse Afsset :	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt	Date de déclaration des intérêts
OULDEHLKIM Mostafa Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	26 mai 2008 15 octobre 2009
VERDIER Cécile Analyse Afsset :	<i>IP-CC</i> COSMED [Intervenant aux "Rencontres réglementaires" pour COSMED (Aucune rémunération) les 30/03/2007 et 26/06/2007. Intervenant sur les conservateurs dans les produits cosmétiques : contraintes et nouvelles opportunités pour l'UFR de Pharmacie de Paris 5 en mai 2007 (Aucune rémunération)	09 septembre 2009

Annexe 4 : Revue bibliographique de la toxicologie de l'argent nanoparticulaire

Introduction sur utilisation de l'argent et des nanoparticules d'argent et l'exposition cutanée

L'argent a été utilisé pour la purification de l'eau, le traitement des plaies, dans les prothèses osseuses, la chirurgie orthopédique de reconstruction, des dispositifs cardiaques, des cathéters et des appareils médicaux. Le progrès de la biotechnologie a permis l'incorporation de l'argent ionisable dans des textiles à usage clinique afin de réduire le risque d'infections nosocomiales ou pour l'hygiène personnelle (Lansdown A.B.G., 2006).

L'action antimicrobienne de l'argent ou des composés à base d'argent apparaît proportionnel aux ions argent monovalent bioactifs (Ag^+) libéré et à leur disponibilité pour interagir avec les membranes des cellules bactériennes ou fongiques. L'argent métal et les composés inorganiques à base d'argent peuvent s'ioniser en présence d'eau, de liquides corporels ou d'exsudats tissulaires. Les ions d'argent sont alors biologiquement actifs et interagissent facilement avec les protéines, les résidus d'acides aminés, les anions libres et des récepteurs membranaires des cellules de mammifères et eucaryotes. La sensibilité des bactéries (et probablement des champignons) à l'argent se rapporte au niveau d'absorption intracellulaire d'argent capable d'interagir et de dénaturer de façon irréversible les principaux systèmes enzymatiques.

L'argent montre une faible toxicité pour l'homme et le risque pour l'homme est considéré comme très faible en cas d'exposition clinique par les voies pulmonaire, orale, cutanée ou par voie hématologique ou urologique. L'ingestion ou l'inhalation chronique de préparations à base d'argent (argent colloïdal en particulier) peut conduire notamment à des phénomènes de dépositions d'argent métal / particules de sulfures d'argent au niveau cutané (argyrie) et/ou oculaire (argyrose) qui ne représentent pas des menaces vitales mais sont esthétiquement indésirables.

Les effets toxiques des substances à base d'argent sont proportionnels au taux de libération d'ions argent libres (Wijnhoven S.W.P., 2009). L'argent métallique semble poser un risque minime pour la santé alors que les produits contenant de l'argent soluble sont plus facilement absorbés et peuvent induire des effets indésirables (Drake P.L. et Hazelwood K.J., 2005; Wijnhoven S.W.P., 2009). En effet, outre argyrie et argyrose, l'exposition à des composés d'argent soluble peut produire d'autres effets toxiques dont des lésions au niveau du foie et des reins, des irritations oculaire, cutanée, respiratoire et du tractus intestinal ainsi que des changements hématologiques (Drake P.L., Hazelwood K.J., 2005). L'argent est absorbé dans le corps humain et gagne la circulation systémique puis est éliminé par le foie et les reins. Le métabolisme de l'argent est néanmoins modulé par l'induction et la liaison aux métallothionéines. En effet, ce complexe atténue la toxicité cellulaire de l'argent et contribue à la réparation tissulaire.

Dans tous les cas, l'allergie à l'argent est une contre-indication connue pour l'utilisation d'argent (Lansdown A.B.G., 2006).

De la même façon, les nanoparticules d'argent ont des propriétés antibiotiques, antifongiques, antivirales et anti-inflammatoires et sont actuellement utilisées dans des crèmes, des textiles, des produits topiques, des prothèses chirurgicales, etc. (Wijnhoven S.W.P., 2009). Selon le rapport très récent du RIVM, les nanoparticules d'argent sont de loin les plus utilisées dans les produits de consommation. Selon la mise à jour la plus récente de la base de données WWI (août 2009), le nombre de produits de consommation et de produits médicaux contenant des nanoparticules d'argent identifiés était de 259.

Ainsi, l'utilisation de nanoparticules d'argent devient de plus en plus répandue et en raison d'une exposition croissante des questions toxicologiques et environnementales doivent être soulevées et, dans ce cas particulier, des données d'absorption cutanée devraient être disponibles. En conditions normales, la peau est protégée par une couche de cellules mortes, l'épiderme, sous lequel se trouve une autre couche, le derme, constituée de cellules vivantes, innervées et vascularisées. L'épiderme, lorsqu'il est intègre, constitue une efficace barrière à la pénétration des particules.

Néanmoins, les quelques travaux de la littérature s'intéressant au passage des nanomatériaux montrent qu'il existe un gradient de taille : plus leur diamètre est petit, meilleure va être leur pénétration à travers l'épiderme (de Jalon E.G., 2001). Peu de données sont actuellement disponibles concernant le passage ultérieur des particules dans la circulation. Il faut noter que l'épiderme peut être facilement altéré (coupures, piqûres...), ce qui pourrait contribuer à une plus profonde pénétration des nanomatériaux en cas d'exposition.

Par ailleurs, si des données sur les concentrations en nanoargent dans divers articles tels que des contenants alimentaires, des compléments alimentaires, des chaussettes et des crèmes ont été récemment publiées (base de données WWI), le nombre de produits de consommation dont la concentration est réellement connue est très faible avec seulement 15 % des produits (variable selon qu'il s'agisse de compléments alimentaires, de cosmétiques ou de pansements) qui ont des concentrations connues en nanoargent se situant entre <6 et 10 000 ppm.

Ainsi, parallèlement à l'attention portée aux nouvelles applications des nanoparticules d'argent, peu d'études renseignent quant aux interactions des nanoparticules d'argent avec l'organisme. La bio distribution, l'accumulation dans certains organes, la dégradation, les éventuels effets indésirables et la toxicité des nanoparticules d'argent et des nanomatériaux manufacturés sont encore peu connus (Chen X., Schluesener H.J., 2008).

En dehors de la concentration, les données de migration et de lixiviation sont également très importantes pour l'évaluation de l'exposition et le risque pour l'homme pour les produits contenant des nanoargent.

A- Effet connu sur l'organe cible

Aucune donnée concernant l'absorption cutanée *in vivo* selon TG 427 (Skin Absorption: *In vivo* method) n'est actuellement disponible dans la littérature.

En revanche, le potentiel de pénétration de la peau nanoparticules d'Ag a été évalué *in vitro* par la mesure du flux transcutané *ex vivo* (Larese F.F., 2009). Les essais ont été effectués par une méthode de diffusion cellulaire sur cellule de Franz (Franz T.J., 1975) sur des peaux humaines intactes ou endommagées. Cette technique est décrite dans la ligne directrice N° 428 de l'OCDE (Absorption cutanée : méthode *in vitro*).

Il faut souligner que les fragments de peau utilisés dans cette étude ont été congelés avant utilisation.

Les nanoparticules d'Ag utilisées au cours de cette étude ont été synthétisées selon une méthode décrite dans la littérature permettant d'éviter une agrégation irréversible lors de la dispersion dans un milieu aqueux (Graf C., 2003). Les mesures faites par microscopie électronique en transmission (MET) ont montré que la taille moyenne des nanoAg est de **25 ± 7,1 nm** (minimum 9,8 nm, maximum 48,8 nm). Aucune autre indication n'est donnée quant à la caractérisation de ces nanoparticules d'argent.

Une solution physiologique a été utilisée comme phase réceptrice (dans le compartiment receveur) et une quantité de 70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanoparticules d'Ag enrobées au polyvinylpyrrolidone dispersées dans une sueur synthétique a été appliquée dans le compartiment donneur, au niveau de la surface externe de la peau pendant 24 heures. Les mesures analytiques dans le fluide récepteur ont été réalisées par Electro Thermal Atomic Absorption Spectroscopy. La limite de détection de l'argent a été établie à 0,1 $\mu\text{g}/\text{l}$. La pénétration de la peau humaine a également été déterminée par microscope à transmission électronique relié à un système d'acquisition d'images digitales pour vérifier la localisation des nanoparticules d'Ag dans les membranes exposées.

Des concentrations médianes en Ag de 0,46 ng/cm^2 (soit 0,0006 % d'absorption) et de 2,32 ng/cm^2 (soit 0,003 % d'absorption) ont été retrouvées dans les solutions réceptrices respectivement quand les solutions de nanoAg ont été appliquées sur une peau intacte et endommagée. Le flux transcutané d'Ag pendant 24 heures sur une peau endommagée a été de $0,62 \pm 0,2 \text{ ng}/\text{cm}^2$ (Larese F.F., 2009).

Ces résultats confirment ceux obtenus au cours d'une précédente étude visant également à évaluer la pénétration cutanée *in vitro* des nanoparticules d'argent (Filon F.L., 2007). Ces expériences avaient également été réalisées selon la méthode de diffusion cellulaire utilisant une cellule de Franz avec des peaux humaines intactes et endommagées. Une solution physiologique a été utilisée comme phase réceptrice (dans le compartiment receveur) et une quantité de 70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanoparticules d'Ag dispersées dans une sueur synthétique a été appliquée dans le compartiment donneur au niveau de la surface externe de la peau pendant 24h. Les mesures dans le fluide récepteur ont été réalisés par Electro Thermal Atomic Absorption Spectroscopy (ETAAS). Une concentration de 0,2 $\mu\text{g}/\text{l}$ d'argent a été retrouvée dans les solutions réceptrices dans lesquelles des membranes de peau endommagées ont été placées. Dans les autres essais, les concentrations dans le compartiment receveur se sont révélées inférieures à la limite de détection. Ces données confirment que le passage transcutané des nanoparticules d'argent au travers la peau intacte ou endommagée est négligeable.

Des études de biosurveillance ont également été effectuées chez des patients brûlés pour lesquels des pansements enrobés de nanoparticules d'argent de 15 nm (*Acticoat*[®], *Smith & Nephew, Inc.*) ont été utilisés pour limiter les sur-infections par libération de nanocristaux d'argent (Trop M., 2006). Les résultats ont montré que, après 1 semaine de traitement local avec *Acticoat*[®], une hépatotoxicité et une argyrie sont apparues chez un jeune patient avec des brûlures profondes. Les enzymes du foie ainsi que les niveaux d'argent plasmatiques et urinaires se sont montrés élevés avec respectivement 107 et 28 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ces effets se sont également révélés réversibles puisque dès que l'arrêt de l'application locale d'*Acticoat*[®], les symptômes cliniques et les enzymes hépatiques sont revenus à des valeurs normales. Des conclusions identiques ont été faites par Vlachou *et al.* (Vlachou E., 2007) sur une étude portant sur 30 patients. Il est à préciser que, pour ces 2 études, on ne sait pas si l'argent mesuré correspond à des ions argent ou à de l'argent nanoparticulaire.

En conclusion, les résultats obtenus au cours d'essais de diffusion cellulaire *in vitro* sur des peaux humaines montrent que l'absorption de nanoparticules d'argent à travers la peau intacte est détectable mais très faible. Néanmoins, étant donnée l'utilisation de fragments de peau congelés au cours de ces études, les résultats pourraient sous-estimer l'exposition interne, c'est-à-dire la partie de l'exposition externe qui est réellement absorbée par la peau.

Dans le cas d'une peau lésée, une augmentation de la perméation d'Ag appliqué sous forme nanoparticulaire est possible (Larese F.F., 2009) voire importante pour *Acticoat*[®] (Trop *et al.*, 2006).

B- Données toxicologiques

Comme nous l'avons mentionné, aucun essai de toxicité aiguë et/ou chronique par la voie cutanée, n'est disponible. En revanche, des études de toxicité par voie orale et par inhalation sont disponibles (Ji J.H., 2007; Ji J.H., 2007; Sung J.H., 2008; Sung J.H., 2009). La voie d'exposition principale est la voie cutanée. Par défaut, l'étude de toxicité *in vivo* par voie orale chez le rat mâle et femelle traités pendant 28 jours est mentionnée.

B1- Toxicité par voie orale

Une étude de toxicité *in vivo* par voie orale a été réalisée chez le rat mâle et femelle de souche Sprague-Dawley traités pendant 28 jours avec des nanoparticules d'argent de diamètre moyen de 60 nm (Kim Y.S., 2008).

Cette étude a été conduite selon la ligne directrice OCDE 407 (Étude de toxicité orale à dose répétée - pendant 28 jours sur les rongeurs) et a suivi les recommandations des Bonnes Pratiques de Laboratoires.

Au cours de cette étude, des nanoparticules d'argent de diamètre moyen de **60 nm** (52,7 – 70,9 nm) de Namatech (Corée) ont été mises en suspension dans la carboxyméthylcellulose à 0,5 %. Aucune indication n'est donnée quant à la caractérisation de ces nanoAg notamment dans l'excipient utilisé.

Des groupes de 10 rats par lot (5 mâles + 5 femelles) ont été traités par voie orale (gavage) aux doses de 30, 300 et 1 000 mg/kg/jour pendant 28 jours sous un volume de 10 ml/kg.

Des témoins négatifs ont été constitués d'animaux recevant l'excipient dans les mêmes conditions que les animaux traités (même voie, même volume).

Après l'examen complet des signes cliniques, du poids, de la consommation d'eau et de nourriture, les paramètres hématologiques, de la chimie clinique, le poids des organes et l'histologie ont été effectués.

Aucun signe clinique visible n'a été noté pendant la période de 28 jours d'exposition et aucune différence dans la consommation de nourriture entre les animaux des groupes traités et des groupes témoin n'a été observée que ce soit chez les rats mâles ou les rats femelles qui n'ont montré aucun changement significatif de poids corporel ou de poids des organes.

Concernant les effets sur la biochimie sanguine, la phosphatase alcaline et le cholestérol ont augmenté significativement pour la dose forte (mâles) et pour les doses forte et moyenne (femelles) indiquant une toxicité hépatique modérée. Les protéines totales ont diminuées pour la dose forte (mâles). Concernant les effets sur les paramètres hématologiques, des diminutions significatives par rapport au groupe témoin ont été observées pour le volume globulaire moyen (dose forte chez les mâles), et pour le nombre de globules rouges, l'hémoglobine et l'hématocrite (doses forte et moyenne chez les femelles).

L'examen histo-pathologique des foies a révélé une augmentation dose-reliée de l'incidence des hyperplasies de la vésicule biliaire autour de la veine centrale du lobule hépatique, avec une infiltration de cellules inflammatoires, aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.

Les concentrations tissulaires ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique. Au cours de cette évaluation, tous les tissus analysés (reins, foie, testicules, cerveau, poumons, estomac et sang circulant) des groupes d'animaux exposés à ces nanoAg pendant 28 jours ont révélé une augmentation statistiquement significative et dose

dépendante de la concentration en Ag. Les reins ont montré une accumulation d'argent sexe-dépendante avec un taux 2 fois plus élevé chez les femelles par rapport aux mâles ce qui n'est pas le cas après des traitements avec l'Ag non nanométrique.

Il est à préciser que les dosages ont été effectués par spectrométrie d'absorption atomique, ce qui ne permet pas de connaître la forme (argent soluble ou nanoparticulaire).

La toxicité hépatique évaluée par l'analyse histo-pathologique s'est traduite par une dilatation de la veine centrale, des hyperplasies des canaux biliaires et un nombre de foci augmenté. L'absorption par voie orale d'argent a montré un effet first-pass hépatique menant à une excrétion biliaire réduisant la distribution systémique. Cette étude tend à montrer une absorption similaire entre nanoAg et Ag. L'augmentation du temps de coagulation reliée à une concentration sanguine croissante d'Ag indique que les nanoparticules d'Ag absorbées oralement entrent dans la circulation sanguine et sont capables d'affecter la coagulation.

C- Autres données toxicologiques

Concernant le potentiel d'irritation / sensibilisation cutanée, aucune donnée concernant n'est actuellement disponible dans des publications internationales. Sur le site Internet d'un producteur de textiles contenant du nano-argent, quelques informations toxicologiques résumées sont fournies sur les nanoAg utilisées de tailles comprises entre 25 et 250 nm.

Il est indiqué

- toxicité aiguë : aucune toxicité n'a été observée pour des doses inférieures à 5g/kg,
- allergénicité : la conclusion a été que la poudre de nanoparticules d'Ag n'a induit aucune sensibilisation cutanée chez le cobaye (Allergen test - ISO 10993-10:1995(E)).

Bien qu'indiquées comme étant disponibles auprès du producteur A1 sur simple demande, nous n'avons eu aucun retour de ce producteur après en avoir effectué la demande.

Aucune autre donnée n'est actuellement disponible dans la littérature.

C- Reprotoxicité

Aucune donnée n'est actuellement disponible dans la littérature.

D- Génotoxicité

Concernant le potentiel génotoxique, très peu de données sont actuellement disponibles dans la littérature. A l'exception d'une publication mentionnant la recherche d'aberrations chromosomiques par le test du micronoyau *in vivo* au niveau de la moelle osseuse (TG 487 In Vitro Micronoyau Test) et de lésions primaires de l'ADN par mesure de la fragmentation dans le test des comètes, on ne retrouve aucun résultat issu des tests réglementaires standards de génotoxicité *in vitro* tels que le test de mutation sur cellules eucaryotes (TG 476 Essai *in vitro* de mutation génique sur des cellules de mammifères) ou encore le test d'aberrations chromosomiques (TG 473 Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères).

En revanche, le potentiel génotoxique *in vivo* des nanoparticules d'argent a été étudié selon la ligne directrice OCDE 474 (Test de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifère) et les

recommandations des Bonnes Pratiques de Laboratoires au cours de l'essai de toxicité de 28 jours.

D1- Génotoxicité *in vivo*

Le potentiel génotoxique des nanoparticules d'argent (diamètre moyen de 60 nm) a été étudié *in vivo* au cours de l'essai de toxicité de 28 jours tel que décrit précédemment (Kim Y.S., 2008). Le test du micronoyau sur moelle osseuse a été effectué selon la ligne directrice OCDE 474 a suivi les recommandations des Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL).

Au cours de cette étude, de Namatech (Corée) ont été mises en suspension dans la carboxyméthylcellulose à 0,5 %. Aucune indication n'est donnée quant à la caractérisation de ces nanoAg notamment dans l'excipient utilisé.

Des groupes de 10 rats par lot (5 mâles + 5 femelles) ont été traités par voie orale (gavage) pendant 28 jours aux doses de 30, 300 et 1000 mg/kg/jour de nanoparticules d'argent (distribution 52,7 – 70,9 nm). Des témoins négatifs ont été constitués d'animaux recevant l'excipient dans les mêmes conditions que les animaux traités (même voie, même volume). En revanche, aucun témoin positif comme produit mutagène de référence (exemple cyclophosphamide) n'a été utilisé ce qui empêche de garantir la sensibilité de la souche à l'action d'un agent clastogène.

Les résultats ne montrent aucune diminution significative du rapport PCE/NCE quelle que soit la dose étudiée, aussi bien chez les animaux mâles que chez les animaux femelles. On peut néanmoins garantir que les animaux ont bien été exposés étant donnée la présence significative d'Ag dans les organes examinés. En effet, tous les tissus analysés (rein, foie, testicules, cerveau, poumon, estomac et sang circulant) des groupes d'animaux exposés au nanoAg pendant 28 jours révèlent une augmentation statistiquement significative et dose dépendante de la concentration en Ag. Les dosages ont été effectués par spectrométrie d'absorption atomique, ce qui ne permet pas de connaître la forme (argent soluble ou nanoparticulaire).

Concernant la génotoxicité, les fréquences moyennes d'érythrocytes polychromatiques micronucléés pour les doses de 30, 300 et 1 000 mg/kg/jour ont été respectivement de 6 - 6,6 et 7,4 vs 5,2 dans le groupe témoin excipient chez les animaux mâles et de 3,5 - 2,4 et 3,4 vs 2,5 dans le groupe témoin excipient chez les animaux femelles.

En conclusion, aucune augmentation statistiquement ou significative n'a donc été mise en évidence chez les animaux traités à aucune des doses étudiées.

D2- Génotoxicité *in vitro*

La génotoxicité des nanoparticules d'Ag (6-20 nm et enrobées d'amidon) a été étudiée *in vitro* parallèlement à la cytotoxicité sur des fibroblastes de poumon humain, les cellules IMR-90, ainsi que sur les cellules U251 issues de glioblastomes humains par le test des comètes et dans le test du micronoyau (AshaRani, PV., 2009).

La cytotoxicité a été évaluée en estimant les changements morphologiques des cellules, leur viabilité, leur activité métabolique et le stress oxydant. Les nanoparticules d'Ag réduisent le contenu en ATP des cellules, induisent des lésions mitochondriales et augmentent la production d'ERO d'une façon dose-dépendante.

La génotoxicité *in vitro* a été évaluée au travers 2 tests :

- le test des comètes (ou SCGE pour single cell gel electrophoresis) qui permet d'identifier les composés induisant des lésions de l'ADN telles que des cassures simple et double brin, des sites alcali-labiles, des pontages inter et intra-brin ou des pontages ADN-protéines et des cassures simple brin de l'ADN associées avec des sites de réparation par excision incomplète dans des cellules de mammifères (Olive P.L., 1990; Ostling O., Johanson K.J., 1984; Singh N.P., 1988) et

- le test du micronoyau avec blocage à la cytokinèse (en présence de cytochalasine B⁵⁹ ¹) qui permet de détecter simultanément le retard mitotique, l'apoptose, les cassures chromosomiques, la perte d'un ou plusieurs chromosomes et la non-disjonction (Kirsch-Volders M., 1997).

Les nanoparticules d'argent enrobées d'amidon utilisées au cours de cette étude ont été synthétisées selon une méthode publiée (Raveendran P., 2003). Le choix de l'agent d'enrobage a été justifié par une stabilité des nanoAg dans le milieu de culture avec un degré d'agglomération plus bas par rapport aux nanoAg coatées avec des protéines ou d'alcool polyvinylique. La distribution analysée par MET et absorption UV montre que les nanoAg utilisées ont un diamètre compris entre 6-20 nm. Aucune autre indication n'est donnée quant à la caractérisation de ces nanoAg.

Les nanoAg ainsi obtenues ont été solubilisées dans l'eau distillée. Aucun contrôle (dispersion dans le milieu utilisé) des préparations des nanoparticules d'argent n'a été effectué.

Les cellules IMR-90 et U251 ont été traitées pendant 48 heures dans un milieu complet, à des concentrations allant de 25 à 400 µg/ml pour le test des comètes et de 100 à 200 µg/ml pour le test du micronoyau.

Les lésions de l'ADN mesurées dans le test des comètes et dans le test du micronoyau avec blocage à la cytokinèse se sont révélées dose-dépendantes et en nombre plus important dans les cellules U251 dans lesquelles une augmentation statistiquement significative a été observée à partir de 25 µg/ml dans le test des comètes et à la concentration minimale étudiée de 100 µg/ml dans le test du micronoyau.

L'analyse par TEM indique la présence de nanoAg à l'intérieur des mitochondries et du noyau, ce qui tend à confirmer leur implication directe dans la toxicité mitochondriale et les lésions de l'ADN. Un mécanisme possible de toxicité est proposé qui implique la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale par les nanoAg conduisant à la production d'ERO et à l'interruption de la synthèse d'ATP, entraînant à son tour des lésions de l'ADN. Le niveau de lésions de l'ADN est probablement augmenté par déposition, suivie par des interactions des nanoparticules d'Ag avec l'ADN entraînant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M⁶⁰.

AshaRani *et al.* proposent un mécanisme possible de toxicité qui implique la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale par les nanoAg (dans cette étude, 6-20 nm) conduisant à la production d'ERO et à l'interruption de la synthèse d'ATP, entraînant à son tour des lésions de l'ADN. Le niveau de lésions de l'ADN est probablement augmenté par déposition,

⁵⁹ Le test du micronoyau a été réalisé en présence de cytochalasine B qui a été démontrée comme diminuant l'endocytose (Doak et al., 2009), ce qui laisse suspecter une sous-estimation de la réponse génotoxique dans ce test.

⁶⁰ Il faut préciser que l'arrêt du cycle cellulaire s'effectue normalement en phase G1/S.

suivie par des interactions des nanoparticules d'Ag avec l'ADN entraînant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Asharani P.V., 2009).

Le potentiel génotoxique des nanoparticules d'Ag a également été recherché par des méthodes non standard :

- la mesure de γ -H2AX (H2AX phosphorylée) qui indique la présence de cassures double-brin de l'ADN qui induisent la phosphorylation de l'histone H2AX au niveau de la serine 139
- le niveau de régulation de la protéine Rad51 (protéine clé dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN)

Le potentiel génotoxique *in vitro* des nanoparticules d'argent (diamètre compris entre 5-10 nm) a été étudié sur la lignée cellulaire HepG2 par la mesure de la protéine γ -H2AX indiquant la présence de cassures double-brin de l'ADN (Kim S., 2009).

La mesure de γ -H2AX a été effectuée après 24 heures de traitement aux concentrations de 1 et 2 $\mu\text{g/ml}$ de nanoAg en utilisant une méthode par immunofluorescence en microscopie confocale. Les nanoparticules d'argent (5-10 nm) utilisées au cours de cette étude ont induit une augmentation significative et dose-reliée de γ -H2AX. De la même façon, AgNO_3 augmente significativement le niveau de γ -H2AX. Cependant, la présence de N-AC inhibe l'induction de cet effet aussi bien pour les nanoAg que pour les ions Ag^{2+} .

Les nanoparticules d'argent de diamètre < 10 nm utilisées au cours de cette étude ont montré une activité génotoxique *in vitro* sur les cellules HepG2 qui est inhibée par la présence d'un anti-oxydant. Aucune différence significative entre l'activité génotoxique des nanoAg (<10 nm) et celle des ions Ag^{2+} n'a été observée.

Cette étude a visé à examiner l'induction de lésions de l'ADN par des nanoparticules d'Ag (fonctionnalisés en surface ou non par des polysaccharides) dans 2 types de cellules de mammifère, des cellules souche embryogéniques et des fibroblastes embryogéniques de souris (Ahamed M., 2008).

Les 2 types de nanoAg utilisées dans cette étude diffèrent essentiellement dans leur composition chimique de surface. Les nanoAg de 25 nm non coatées ont été traitées par des hydrocarbures. Les nanoAg de 25 nm coatées ont été obtenues par réduction des ions Ag^{2+} en solution polysaccharidique.

Les solutions de traitement ont été préparées dans le milieu de culture SANS sérum avant chaque essai.

L'incorporation et la localisation de ces nanoAg dans les 2 types cellulaires ont été vérifiées après traitement avec une sonde fluorescente sonde CTG qui colore complètement la cellule avec confirmation par microscopie confocale. Les résultats ont montré que les nanoAg non coatées s'agglomèrent et peuvent être exclus de certains organites tels que le noyau et les mitochondries alors que les nanoparticules d'argent coatées ne forment pas d'agglomérats et sont distribuées dans toute la cellule.

Après des traitements de 4 et 24 heures, les 2 types de nanoAg ont entraîné une sur-régulation des gènes codant pour la protéine p53 (contrôle du cycle cellulaire) et pour Rad51 (protéine clé dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN) et une augmentation de l'expression de H2AX phosphorylée (les cassures double-brin de l'ADN induisent également la phosphorylation de l'histone H2AX). Les nanoparticules d'Ag coatées ou non induisent

également de l'apoptose telle que mesurée par l'expression de la protéine annexine V. La cytotoxicité des nanoAg a été évaluée par la technique au MTT (*i.e.* 3-[4,5-diMéthylThiazol-2-yl]-2,5diphényl tétrazolium bromide) sur les cellules souches et les fibroblastes embryogéniques de souris après 24, 48 et 72 heures d'exposition à la concentration de 50 µg/ml. Le nombre de cellules viables diminue significativement en fonction du temps. L'effet des nanoAg coatées sur la viabilité des 2 types cellulaires est plus important que celui des nanoAg non coatées.

Les auteurs concluent qu'en fonction de leur chimie de surface, les nanoAg induisent différents degrés de lésions de l'ADN : les nanoAg coatées montrent un niveau de lésions plus important que les nanoAg non coatées. Ces résultats suggèrent que les particules enrobées de polysaccharides forment moins d'agglomérats alors que l'état d'agglomération des particules non coatées limite la disponibilité et le passage trans-membranaire.

En conclusion, les résultats d'Ahamed *et al.* indiquent que les nanoAg coatées et non coatées ne sont distribuées de la même façon dans la cellule et entraînent ainsi des niveaux de lésions de l'ADN différents dans les 2 types de cellules de mammifère utilisés. Les 2 types de nanoAg induisent une sur-expression de la protéine p53, des cassures double-brin de l'ADN et de l'apoptose aussi bien dans les cellules souche que les fibroblastes embryogéniques de souris. Les nanoAg coatées avec des polysaccharides ont induit des lésions cellulaires plus importantes (niveau d'expression p53, Rad51, p-H2AX, annexine V et MTT) ce qui suggère un rôle important des propriétés physico-chimiques de surface (Ahamed M., 2008).

En conclusion, il existe un réel manque d'informations concernant l'activité génotoxique des nanoAg comme le souligne également Singh *et al.* (Singh N., 2009). Seul un test *in vivo* a été réalisé selon une ligne directrice OCDE (Kim Y.S., 2008). La génotoxicité *in vitro* des nanoparticules d'Ag a été étudiée sur des modèles cellulaires non standard qui ne suivent pas les recommandations de lignes directrices de l'OCDE. Au cours de ces essais, les nanoparticules d'Ag ont induit des lésions de l'ADN qui suggèrent la présence de cassures double-brin de l'ADN, événements génétiques qui devraient être vérifiés *in vivo* sur le (ou les) organe(s) cible.

E- Mécanisme inflammatoire / Potentiel de génération de ROS/RNS et induction de stress oxydant

Les réponses cellulaires induites par des nanoparticules d'argent ont été évaluées dans de nombreuses études *in vitro*. Ces études se sont particulièrement intéressées à l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* sur plusieurs modèles cellulaires (de diverses origines), à la corrélation entre l'activité cytotoxique et à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), à l'atteinte mitochondriale, à l'induction d'apoptose, à la nécrose et à l'inflammation. Ces études à visée mécanistique ont en outre cherché à étudier les liens entre ces différents phénomènes et la taille des nanoparticules d'Ag et ont visé à comparer les résultats obtenus avec ceux des ions Ag⁺.

E1 - Cytotoxicité / Potentiel de génération de ROS/RNS et induction de stress oxydant *in vitro*

Hussain *et al.* (Hussain S.M., 2005) ont étudié la cytotoxicité et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) *in vitro* sur 2 types de nanoparticules d'argent (**15 et 100 nm**) sur la lignée BRL 3A (cellules immortalisées de spermatogonies de type A isolées à partir de testicules de souris).

Les auteurs indiquent que les nanoparticules d'argent utilisées au cours de cette étude ont une taille de 15 et 100 nm. Aucune autre indication n'est donnée quant à la caractérisation de ces nanoAg.

Les cellules BRL 3A ont été traitées pendant 24 heures dans un milieu sans sérum, à des concentrations allant de 10 à 50 µg/ml. Aucun contrôle (dispersion dans le milieu utilisé) des préparations des nanoparticules d'argent n'a été effectué.

A la fin de la période de 24 heures de traitement, les changements morphologiques ont été évalués. A des concentrations < 10 µg/ml, les cellules BRL 3A ne montrent pas de différence morphologique par rapport aux cellules non traitées. En revanche, à des doses plus élevées, les cellules BRL 3A apparaissent plus petites et deviennent irrégulières

La cytotoxicité a été évaluée en utilisant 3 marqueurs : le test MTT (mesure de la fonction mitochondriale), le test au bleu Alamar et le test LDH (marqueur d'intégrité membranaire).

Une augmentation significative et dose-reliée de LDH a été notée à des concentrations de nanoparticules d'Ag ≥ 10 µg/ml. Une différence significative a été notée entre les types de nanoAg avec une cytotoxicité plus importante pour les nanoparticules de 100 nm par rapport à celles de 15 nm avec des CI50 calculées respectives de 24 et 50 µg/ml.

Les résultats du test au MTT montrent une diminution statistiquement significative à partir de 5 µg/ml mais aucune différence significative n'a été observée entre les 2 types de nanoAg (CI50 calculées respectives de 19 et 24 µg/ml respectivement pour les nanoAg de 100 et 15 nm).

La génération d'ERO a été mesurée par cytométrie en flux en présence de diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorécéine après incubation des cellules traitées après 6 heures aux nanoparticules d'argent de 15 et 100 nm en utilisant une gamme de concentrations allant de 5 à 50 µg/ml. Le glutathion réduit (GSH) a également été dosé. Le potentiel membranaire mitochondrial a été mesuré par la technique de l'incorporation de la rhodamine 123.

Les résultats montrent que le traitement avec les nanoAg (15 et 100 nm) entraîne une augmentation significative et dose-reliée des niveaux d'ERO intracellulaires jusqu'à environ 10 fois le niveau du témoin négatif pour les concentrations de 25 et 50 µg/ml. Une déplétion significative du GSH par rapport au témoin (d'environ 70 %) a été retrouvée à 25 µg/ml de nanoAg 15 et 100 nm. A l'inverse, le potentiel membranaire mitochondrial diminue significativement à 25 et 50 µg/ml.

En conclusion, selon les auteurs, les nanoparticules d'Ag utilisées dans cette étude (15 et 100 nm) induisent des modifications cellulaires morphologiques, une fuite de LDH et un dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules BRL 3A. Ces nanoAg entraînent une augmentation de la génération d'ERO, une déplétion en GSH et une diminution du potentiel membranaire mitochondrial. Le stress oxydant contribue à la cytotoxicité de ces nanoparticules.

Braydich-Stolle *et al.* ont également étudié la cytotoxicité *in vitro* de nanoparticules d'argent (15 nm) sur une autre lignée de spermatogonies de type A, les cellules C18-4 immortalisées et isolées à partir de testicules de souris (Braydich-Stolle L., 2005).

Les auteurs indiquent que les nanoparticules d'argent utilisées au cours de cette étude ont une taille de 15 nm. Aucune autre indication n'est donnée quant à la caractérisation de ces

nanoAg. Les nanoAg ont été dispersées dans un tampon phosphate. Aucun contrôle (dispersion dans le milieu utilisé) des préparations des nanoparticules d'argent n'a été effectué.

Les cellules C18-4 ont été traitées pendant 48 heures à des concentrations allant de 5 à 100 µg/ml. A la fin de la période de traitement, les changements morphologiques ont été évalués. A partir de la concentration de 10 µg/ml, les cellules C18-4 montrent des changements morphologiques de type nécrotique et apoptotique par rapport aux cellules non traitées.

La cytotoxicité a également été évaluée après le traitement en utilisant 2 marqueurs : le test MTS et le test LDH.

La fonction mitochondriale a été évaluée par la technique utilisant un sel de tétrazolium (similaire au MTT mentionné plus haut, le MTS[a]). Les résultats du test MTS[a] montrent un effet cytotoxique des nanoAg (15 nm) vis-à-vis des cellules C18-4 avec une CI50 après 48 heures de traitement estimée à 8,75 µg/ml. Il est intéressant de préciser que, en comparaison, le carbonate d'argent s'est révélé nettement moins cytotoxique avec une CI50 estimée de 408 µg/ml (soit une cytotoxicité environ 50 fois moins importante).

Le dosage de la LDH (marqueur d'intégrité membranaire), a permis de calculer une CI50 de 2,5 µg/ml pour les nanoAg (en comparaison, le carbonate d'Ag n'a induit aucune cytotoxicité à la concentration maximale testée de 100 µg/ml ce qui indique une cytotoxicité au moins environ 40 fois moins importante).

L'induction d'apoptose/nécrose déterminée par la technique à la coloration au YO-PRO-1 s'est montrée significative dès la concentration faible de 5 µg/ml.

En conclusion, selon les auteurs, les nanoparticules d'Ag utilisées dans cette étude (15 nm) induisent des modifications morphologiques des cellules, une fuite de LDH et un dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules C18-4, qui se sont révélées plus sensibles que les cellules BRL 3A (Braydich-Stolle L., 2005).

La cytotoxicité in vitro des nanoparticules d'argent (7-20 nm) a également été étudiée sur 2 modèles cellulaires secondaires, les lignées A431 (cellules issues d'un carcinome cutané humain) et HT-1080, cellules issues d'un fibrosarcome humain (Arora S., 2008) et sur 2 types de cellules primaires de souris, *i.e.* des fibroblastes et des hépatocytes (Arora S., 2009).

Les nanoparticules d'argent utilisées au cours de cette étude ont été synthétisées selon une méthode brevetée. Elles ont été utilisées sous forme de suspension aqueuse colloïdale et se sont montrées stables dans le milieu de culture. Les nanoAg sont sphériques et plus de 90 % ont un diamètre compris entre 7-20 nm (analyse par MET haute résolution). Aucune autre indication n'est donnée quant à la caractérisation de ces nanoAg.

La première partie de ces études a visé à mettre en évidence des changements morphologiques. Des cellules A431 ou HT-1080 ont été traitées pendant 24 heures à des concentrations allant de 0,76 à 50 µg/ml. Les fibroblastes ont été traités pendant 24 heures à des concentrations allant de 6,25 à 100 µg/ml et les hépatocytes de 12,5 à 200 µg/ml. Les concentrations en argent ont été déterminées dans toutes les préparations par spectrométrie d'absorption.

A la fin de la période de 24 heures d'incubation, les changements morphologiques ont été observés. Les résultats montrent que les cellules HT-1080 et les fibroblastes non traités apparaissent polyédriques ou en étoile et présentent des expansions lamellaires fines qui

rejoignent les cellules voisines. Avec des concentrations croissantes de nanoparticules d'argent (de 6,25 à 50 µg/ml pour les HT-1080 et de 50 à 100 µg/ml pour les fibroblastes), ces cellules apparaissent moins polyédriques, plus fusiformes, tassées et arrondies. Les cellules primaires hépatiques ne montrent aucun changement morphologique jusqu'à 100 µg/ml et apparaissent réfringentes avec des membranes cellulaires irrégulières à des concentrations > 200 µg/ml.

Les cellules A431 témoin sont polygonales avec des contacts intercellulaires importants alors que les cellules traitées avec des nanoparticules d'argent (de 6,25 à 50 µg/ml) montrent une morphologie bipolaire de type fuseau avec moins de contacts intercellulaires. A des concentrations de nanoparticules d'argent > à 6,25 µg/ml, le nombre de cellules décroît significativement et les cellules apparaissent arrondies et réfringentes.

L'évaluation de la cytotoxicité a été effectuée en utilisant le test XTT (mesure de la fonction mitochondriale) après traitement par des solutions de nanoparticules d'argent pendant 24 heures. Les résultats montrent une cytotoxicité dose-relée sur les différents modèles cellulaires avec des valeurs de CI50 de 10,6 et 11,6 µg/ml respectivement sur HT-1080 et A431 (Arora S., 2008) et de 61 et 449 µg/ml respectivement sur des fibroblastes et des hépatocytes (Arora S., 2009). Les études par MET révèlent la présence d'agrégats sphériques, noirs à l'intérieur des mitochondries des fibroblastes exposés, à l'intérieur des mitochondries et des vacuoles des hépatocytes.

Le stress oxydant a été évalué en mesurant le glutathion réduit (GSH), les activités superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathion peroxydase (GPx) ainsi que la peroxydation lipidique sur des extraits cellulaires obtenus après traitement à la CI50, *i.e.* 6,25 µg/ml, pendant 24 heures.

Sur cellules HT-1080, le traitement avec des nanoparticules d'argent à 6,25 µg/ml induit une augmentation de la peroxydation lipidique d'environ 2,5 fois. En revanche, une diminution d'environ 2,5 fois du niveau de GSH a été notée. Enfin, les changements de niveaux de SOD (diminution de 1,6 fois), catalase et GPx ne se sont pas révélés statistiquement significatifs. Sur cellules A431, le traitement avec des nanoparticules d'argent à 6,25 µg/ml induit une augmentation de la peroxydation lipidique d'environ 2 fois alors qu'une diminution d'environ 2 à 3 fois a été notée respectivement pour les niveaux de GSH et de SOD. Enfin, les changements de niveaux de catalase et GPx ne se sont pas révélés statistiquement significatifs (Arora S., 2008).

Sur fibroblastes, le traitement avec des nanoparticules d'argent induit une diminution de la lipoperoxydation (1,4 fois) et une légère augmentation du niveau de GSH d'environ 1,2 fois alors que les niveaux de SOD ne changent pas significativement. Sur hépatocytes primaires, les nanoparticules d'argent induisent une faible augmentation des niveaux de GSH et de SOD (respectivement environ 1,1 et 1,4 fois) alors que la peroxydation lipidique n'est pas statistiquement modifiée (Arora S., 2009).

La détermination de l'induction d'apoptose a été recherchée par séparation électrophorétique en gel d'agarose (image typique en échelle, dite image en « ladder »).

Pour les cellules HT-1080 et A431, des essais de fragmentation de l'ADN génomique ont été effectués après 24 heures de traitement à la concentration de 6,25 µg/ml de nanoparticules d'argent (retenue comme CI50/2 et utilisée dans les essais biochimiques et détermination de l'activité apoptotique).

L'analyse tend à démontrer la formation de "DNA ladder" typique de l'apoptose qui est généralement caractérisée par la condensation de la chromatine, la formation de corps apoptotiques et la fragmentation internucléosomale de l'ADN. Cette fragmentation ne permet pas l'identification de cellules entrant en apoptose individuellement. Dans une expérience indépendante, des essais colorimétriques spécifiques de la caspase 3 (qui démontre la

progression irréversible de l'apoptose) ont été réalisés pour déterminer les concentrations de nanoparticules d'argent induisant de l'apoptose et de la nécrose sur cellules A431 et HT-1080. Ces essais montrent que les nanoparticules d'argent induisent de l'apoptose à des concentrations comprises entre 1,56 et 6,25 µg/ml ou entre 0,78 et 6,25 µg/ml respectivement sur cellules A431 et HT-1080.

Pour les fibroblastes et les hépatocytes primaires, des essais colorimétriques de Caspase-3 ont été réalisés à des concentrations allant de 0,78 à 500 µg/ml de nanoparticules d'argent. Concernant les fibroblastes, les nanoparticules d'argent induisent de l'apoptose sur une gamme de concentrations comprise entre 3,12 et 50 µg/ml et de la nécrose à partir de 30 µg/ml alors que pour les hépatocytes primaires, la gamme de concentrations entraînant de l'apoptose est comprise entre 12,5 et 500 µg/ml et de la nécrose à partir de 900 µg/ml.

En conclusion, dans ces études, une corrélation est faite entre cytotoxicité/génération d'ERO et potentiel apoptogène de ces nanoparticules d'argent (7-20 nm).

Les valeurs de CI50 obtenues sur les cellules primaires (particulièrement les hépatocytes) sont clairement plus élevées que celles observées sur les lignées secondaires ce qui suggère que cellules primaires offrent une plus forte « résistance » au traitement par des nanoAg (Arora S., 2009). La présence d'agrégats à l'intérieur des mitochondries pourrait conduire à la production d'ERO. Cependant, sur ces lignées primaires, les auteurs ont montré que le stress oxydant induit par des concentrations de l'ordre de CI50/2 est pris en charge par les systèmes enzymatiques anti-oxydant et ne persistait pas suffisamment longtemps.

Afin de vérifier l'hypothèse du lien direct entre génération d'ERO et apoptose, Hsin *et al.* (Hsin Y.H., 2008) ont également étudié la cytotoxicité et l'induction d'apoptose in vitro sur de la poudre d'Ag (< 250 µm, Sigma) et sur 2 types différents de particules d'argent nanostructurées commerciales (1-100 nm) sur les lignées NIH3T3 (fibroblastes de souris), A10 (cellules de muscle lisse de rat) et HCT116 (cellules humaines issues d'une tumeur cancéreuse de colon).

Les nanoparticules d'argent utilisées au cours de cette étude ont été obtenues dans le commerce (*Ching-Tai* et *Sun-Lan*). La structure de ces nanoAg a été examinée par MET. Après dilution dans l'eau purifiée et séchage à l'air, les échantillons ont été placés sur une grille de cuivre coâtée avec un film carbone puis colorés dans une solution à 2 % d'acide phosphotungstique. Les nanoAg ont un diamètre compris entre 1-100 nm. Aucune autre indication n'est donnée quant à la caractérisation de ces nanoAg.

L'évaluation de la cytotoxicité a été effectuée en utilisant le test MTT (mesure de la fonction mitochondriale) après un traitement de 24 heures.

Pour les cellules NIH3T3 et A10, les particules de nanoAg (*Ching-Tai* et *Sun-Lan*) se sont révélés cytotoxiques (< 50% viabilité) après 24 heures de traitement à des concentrations ≥ 50 µg/ml. Les cellules HCT116 se sont révélées moins sensibles avec un effet modeste à la concentration de 50 µg/ml de particules de nanoAg (*Sun-Lan*). Parallèlement, l'Ag non nanométrique n'a montré aucune toxicité à 50 µg/ml même après 72 heures de traitement, quel que soit le type cellulaire.

Afin d'évaluer l'impact de l'apoptose dans la cytotoxicité, l'activité apoptique a été mesurée par cytométrie en flux par la technique à l'annexine V couplée au FITC et en présence d'iodure de propidium (IP) ce qui permet de distinguer plusieurs types de populations : les cellules vivantes, sur lesquelles l'annexine V ne se lie pas, les cellules en phase précoce d'apoptose (IP-/FITC+), les cellules en phase tardive d'apoptose ou en début de nécrose (IP+/FITC+) et les cellules nécrotiques (IP+/FITC-).

Le pourcentage de cellules NIH3T3 en apoptose précoce augmente significativement après 24 heures de traitement à 50 µg/ml de particules de nanoAg (*Ching-Tai* et *Sun-Lan*) alors qu'à la concentration supérieure de 100 µg/ml de particules de nanoAg (*Ching-Tai*), l'apoptose augmente très peu pour les cellules HCT116. Pour ces cellules, un traitement prolongé jusqu'à 72 heures entraîne l'apparition de nécrose mais pas d'augmentation de l'apoptose. En parallèle, l'argent non nanométrique n'a montré aucun effet sur l'induction de l'apoptose quel que soit le type cellulaire.

L'induction d'apoptose par les nanoparticules d'argent a été confirmée par microscopie confocale par immunofluorescence qui montre, dans les cellules NIH3T3, un relargage de cytochrome c des mitochondries vers le cytoplasme (associé avec la translocation de Bax du cytoplasme aux mitochondries) après 24 heures de traitement à 50 µg/ml de particules de nanoAg (*Ching-Tai*) alors que, pour les cellules non traitées, le cytochrome c reste bien dans les mitochondries. De la même façon, le cytochrome c reste localisé dans les mitochondries des cellules HCT116 (et Bax reste cytoplasmique) même après 24 heures de traitement à 50 µg/ml de particules de nanoAg (*Ching-Tai*).

D'après les auteurs, ces résultats indiquent que l'apoptose induite par les nanoparticules d'Ag est associée avec la translocation de Bax et le relargage de cytochrome c mitochondrial pour les cellules NIH3T3, sensibles aux nanoAg, mais pas dans les cellules HCT116.

Pour déterminer les mécanismes d'induction de l'apoptose par les nanoAg, les auteurs ont examiné l'expression de certains gènes régulateurs de l'apoptose (PARP et JNK). La protéine PARP-1, qui est activée par liaison ou cassures simple ou double brin de l'ADN et est en particulier impliquée dans le système de réparation par excision de base, intervient également dans l'apoptose (la mort cellulaire est accompagnée de la destruction de la PARP par les caspases). Les résultats démontrent que le clivage de PARP et la phosphorylation de JNK, accompagnés par la phosphorylation de la protéine p53, sont augmentés dans les cellules NIH3T3 (sensibles au nanoAg) traitées avec 50 µg/ml de nanoAg *Ching-Tai*. En revanche, dans les cellules HCT116, le clivage de PARP n'est pas détecté après traitement à 100 µg/ml nanoAg *Ching-Tai* alors que les protéines JNK et p53 sont activées. Cette observation indique qu'il y a induction de nécrose plutôt que d'apoptose dans les cellules HCT116 après 72 heures d'exposition aux nanoAg *Ching-Tai*. L'expression de la protéine Bcl-2 par analyse RT-PCR (confirmée par Western blot) révèle que les nanoAg *Ching-Tai* augmentent le niveau d'ARN Bcl-2 après 12 heures de traitement dans les cellules HCT116 mais pas dans les cellules NIH3T3 ce qui signifie qu'une sur-régulation des protéines « anti-apoptotiques » a lieu dans les cellules HCT116.

Par ailleurs, afin de déterminer si la différence de sensibilité entre les 2 types cellulaires est liée à des différences d'incorporation de nanoAg, une cinétique d'accumulation d'Ag a été réalisée. Celle-ci montre qu'un traitement à 50 µg/ml de nanoAg entraîne une augmentation substantielle des concentrations intracellulaires d'Ag dans les cellules NIH3T3 après 8 heures. Des résultats similaires sont obtenus à 100 µg/ml de nanoAg dans les cellules HCT116. L'incorporation s'est révélée très rapide avec les nanoAg *Ching-Tai* qui ont montré une accumulation intracellulaire significative dès la 1^{ère} minute de traitement.

Le stress oxydant a également été évalué en mesurant des ERO par cytométrie en flux après incubation des cellules traitées en présence de diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine. Les résultats montrent que le traitement avec des nanoAg (*Ching-Tai*) entraîne une augmentation significative des niveaux d'ERO intracellulaires aussi bien dans les cellules HT-1080 que dans les cellules HCT116. L'inhibition de la génération d'ERO par un anti-oxydant, la N-acétyl cystéine (précurseur de la synthèse du glutathion) réduit le pourcentage de cellules HT-1080 entrant en apoptose ce qui démontre que les ERO (majoritairement produites par les mitochondries) interviennent dans l'apoptose induite par les nanoAg.

En conclusion, Hsin *et al.* (Hsin Y.H., 2008) ont montré un mécanisme reliant la génération d'ERO et l'apoptose (activation de JNK) à la cytotoxicité induite par les nanoAg via un mécanisme apoptotique mitochondrial pour les nanoparticules d'Ag (1-100 nm).

Carlson *et al.* ont comparé la cytotoxicité et la génération d'ERO induites *in vitro* des nanoparticules d'argent en fonction de leur taille (15, 30 et 55 nm) sur macrophages alvéolaires de rat (Carlson C., 2008).

La caractérisation (taille et morphologie) des nanoparticules d'Ag, vérifiée par SEM (Scanning Electron Microscopy), a montré des nanoAg sphériques de taille croissante d'environ 15, 30 et 55 nm.

Une fois en suspension, ces nanoparticules tendent à s'agglomérer et sédimentent rapidement dans la solution. Des tests préalables de dispersion ont donc été réalisés dans du tampon phosphate physiologique (PBS, pH 7,4), dans de l'eau désionisée, dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et dans de l'éthanol afin d'examiner leur comportement. Sur la base de ces essais de dispersion, l'eau désionisée a été retenue pour préparer les différentes solutions stock des nanoAg 15, 30 et 55 nm, les solutions finales étant préparées dans le milieu de culture Ham F-12K supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal.

Des macrophages alvéolaires de rat ont été traités pendant 24 heures à des concentrations allant jusqu'à la concentration maximale de 100 µg/ml. A la fin de la période de 24 heures d'incubation, les changements morphologiques ont été observés sous microscope inversé à contraste de phase.

Les macrophages alvéolaires de rat témoin apparaissent symétriques alors que les cellules traitées avec 25 et 75 µg/ml de nanoAg 15 nm ont perdu leur membrane plasmique, apparaissent tassées et de nombreux débris cellulaires sont observés. Les macrophages alvéolaires de rat traités avec 25 et 75 µg/ml de nanoAg 30 nm sont plus larges et des agglomérats de nanoparticules sont visibles dans et autour des cellules. Concernant les nanoAg 55 nm, les cellules traitées avec 25 et 75 µg/ml s'agglutinent entre-elles avec la présence de larges agglomérats de nanoparticules à leur surface.

Les macrophages alvéolaires traités avec les nanoparticules d'Ag de 15 nm semblent avoir subi les changements morphologiques cellulaires les plus importants. Des images haute résolution (TEM) des cellules traitées avec 25 µg/ml de nanoAg 55 nm pendant 24 heures montrent une internalisation par les cellules dans des vacuoles. Le mécanisme d'incorporation n'a pas été étudié notamment, la question de la forme sous laquelle pénètrent les nanoparticules dans la cellule (individualisées ou agglomérées) n'a pas été déterminée.

La cytotoxicité a été évaluée après traitement de 24 heures en utilisant 2 marqueurs : le test MTT et le test LDH.

Les résultats du test MTT montrent une diminution significative de la fonction mitochondriale observée pour les macrophages alvéolaires exposés aux nanoAg 15, 30 et 55 nm à des concentrations allant de 10 à 75 µg/ml. Les CI50 à 24 heures calculées sont d'environ 28 et 33 µg/ml respectivement pour les nanoAg 15 et 30 nm alors que pour les nanoparticules d'Ag de 55 nm, la CI50 est > 75 µg/ml.

Une diminution significative et dose-reliée de la viabilité cellulaire a été notée d'après les résultats obtenus dans le test de relargage de LDH. D'une façon très similaire au test MTT, cette diminution a été observée à partir d'environ 10 µg/ml pour les macrophages alvéolaires exposés aux nanoAg de 15 et 30 nm (CI50 respectives d'environ 15 et 14 µg/ml) alors que pour les nanoparticules d'Ag de 55 nm, la CI50 est > à 75 µg/ml.

L'ensemble de ces résultats démontre que le niveau de cytotoxicité tel que déterminé par les méthodes MTT et LDH est dépendant de la taille des nanoAg.

Afin d'évaluer le rôle du stress oxydant, les dosages des ERO et du GSH ont été effectués. La génération d'ERO a été mesurée par cytométrie en flux en présence de diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorécéine selon Hussain *et al.* Le potentiel membranaire mitochondrial a également été mesuré par la technique de l'incorporation de la rhodamine 123 (Hussain S.M., 2005).

Les résultats montrent que le traitement avec des nanoparticules d'Ag de 15 nm entraîne une augmentation significative et dose-relée des niveaux d'ERO intracellulaires jusqu'à environ 7 et 15 fois le niveau du témoin négatif respectivement pour les concentrations de 25 et 50 µg/ml. Les niveaux d'ERO ne sont pas significativement augmentés en présence de nanoAg de 30 et 55 nm. Parallèlement, le potentiel membranaire mitochondrial diminue significativement de 60 à 30 % respectivement avec des nanoparticules d'Ag de 15 et 30 nm.

Enfin, une déplétion totale du GSH a été retrouvée pour les nanoAg 15 et 30 nm à 50 µg/ml alors que pour les nanoAg de 55 nm, à concentration équivalente, la déplétion n'est que d'environ 25% par rapport au témoin.

Le choix d'utiliser des macrophages alvéolaires, cellules du tractus respiratoire, apparaît pertinent au regard de la recherche d'induction d'ERO. Ils sont en effet capables de sécréter des médiateurs inflammatoires tels que chimiokines et cytokines. Afin de déterminer si les macrophages alvéolaires de rat répondent à un traitement avec des nanoAg de 15, 30 et 100 nm ont été traités pendant 24 heures à des concentrations allant de 5 à 25 µg/ml et les marqueurs caractéristiques, TNF- α , MIP-2, IL-1 β et IL-6 ont été mesurés dans les surnageants par méthode ELISA. Les résultats montrent une augmentation significative des niveaux de TNF- α , MIP-2 et IL-1 β sur l'ensemble de la gamme de concentrations et quelle que soit la taille des nanoparticules d'Ag. En revanche, il n'y a eu aucune détection d'IL-6.

En conclusion, Carlson *et al.* (Carlson C., 2008) estiment que le niveau de cytotoxicité tel que déterminé par les méthodes MTT et LDH apparaît également dépendant de la taille des nanoAg avec une augmentation de la génération d'ERO et de la déplétion en GSH en présence de nanoAg de 15 nm. Ces données suggèrent que le stress oxydant contribue à la cytotoxicité de ces nanoparticules.

En revanche, des nanoparticules de tailles supérieures à 30 et 55 nm induisent une cytotoxicité alors que les niveaux d'ERO ne sont pas significativement augmentés.

En parallèle, une augmentation significative de la sécrétion des médiateurs de processus inflammatoires tels TNF- α , MIP-2 et IL-1b a été notée semble indépendante de la taille des nanoparticules d'Ag.

Comme décrit dans le paragraphe dédié à la génotoxicité *in vitro*, la cytotoxicité des nanoparticules d'Ag (6-20 nm et enrobées d'amidon) a été étudiée *in vitro* sur des fibroblastes de poumon humain, les cellules IMR-90, ainsi que sur les cellules U251 issues de glioblastomes humains (Asharani P.V., 2009).

La toxicité a été évaluée en estimant les changements morphologiques des cellules, leur viabilité, leur activité métabolique et le stress oxydant.

Les cellules IMR-90 et U251 ont été traitées pendant 48 heures dans un milieu complet, à des concentrations allant de 25 à 400 µg/ml. A la fin de la période de traitement, les changements morphologiques des cellules ont été évalués sous microscope. A des concentrations < 10 µg/ml, les cellules IMR-90 et U251 forment principalement des amas.

La cytotoxicité a été évaluée après des traitements de 24, 48 et 72 heures par la numération des cellules viables et métaboliquement actives, en se basant sur la quantification du contenu en ATP. Une diminution dose-dépendante et fonction de la durée de traitement a été notée pour les 2 types cellulaires à partir de 48 heures de traitement (aucun effet observé après 24 heures). En parallèle, l'observation microscopique ne montre pas de mort cellulaire massive ce qui implique plutôt un « arrêt » métabolique. Les résultats de l'étude de la fonction mitochondriale déterminée par la mesure fluorimétrique des cellules ayant une activité métabolique (basée sur la réduction de rézasurine en résorufine par les enzymes mitochondriales et microsomales) confirment cet « arrêt » métabolique via une chute de l'activité mitochondriale. Les lésions fonctionnelles et structurales des mitochondries pourraient mener vers cet « arrêt » métabolique suivi d'une diminution du contenu en ATP.

La génération d'ERO a été mesurée par cytométrie en flux en présence de diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorécéine (qui est fluorescent si il est oxydé par les ERO intracellulaires) et de dihydroéthidium (qui émet une fluorescence rouge en présence du radical superoxyde). Les cellules IMR-90 et U251 ont été traitées pendant 2 ou 5 heures avec des nanoparticules d'argent de 15 nm en utilisant une gamme de concentrations allant de 25 à 200 µg/ml.

L'analyse montre une augmentation significative de la production de l'anion superoxyde (OH^{\cdot}) et de H_2O_2 dans les cellules traitées à des concentrations de 25 et 50 µg/ml de nanoAg (15 nm).

Le potentiel apoptogène a été mesuré par cytométrie en flux par la technique à l'annexine V couplée au FITC et en présence d'iodure de propidium (IP) qui permet de distinguer les cellules en phase précoce d'apoptose (IP-/FITC+), les cellules en phase tardive d'apoptose ou en début de nécrose (IP+/FITC+) et les cellules nécrotiques (IP+/FITC-). Les données obtenues indiquent que seul un faible pourcentage de cellules entrent en apoptose ou en nécrose après des traitements à fortes concentrations de nanoAg :

- augmentation de 5-9 % de la population cellulaire apoptotique précoce / témoin négatif à des concentrations comprises entre 25-100 µg/ml qui pourrait être attribuée à la production de ERO observée,
- augmentation de 16 % de mort cellulaire par apoptose tardive et nécrose / témoin négatif.

En conclusion, les nanoparticules d'Ag (6-20 nm) réduisent le contenu en ATP des cellules, induisent des lésions mitochondriales et augmentent la production d'ERO d'une façon dose-dépendante.

Afin de distinguer la toxicité induite par les ions Ag^+ de celle induite par les nanoparticules d'argent, Kim *et al.* ont étudié la cytotoxicité in vitro des nanoparticules d'argent (< 10 nm) sur la lignée continue HepG2, cellules issues d'un hépatome humain (Kim S., 2009).

Les nanoparticules d'argent utilisées au cours de cette étude ont un diamètre < 10 nm et ont été obtenues sous forme de solution. Un échantillon de cette solution a été placé sur une grille de cuivre, séché à l'air et la structure a été examinée par MET. Les nanoAg utilisées ont également été observées après incubation de 24 heures à 37°C dans le milieu de culture.

La morphologie observée par TEM a montré que les particules d'argent nanostructurées en solution initiale sont sphériques, bien dispersées et de diamètre compris entre 5-10 nm. Cependant, des agglomérats de 100-300 nm ont été observés après incubation dans le milieu de culture sans cellules. La localisation intracellulaire a également été déterminée.

Après un traitement pendant 24 heures, les cellules HepG2 ont subi une pré-fixation à 2% de glutaraldéhyde suivie d'une post-fixation au tétraoxyde d'osmium (1 %). Puis, les cellules ont été déshydratées dans différents bains d'éthanol avant d'être incluses dans la résine de Spurr. Les sections de 1 µm et de 80 nm ont été analysées à l'aide d'un microscope à fond noir et par microscope à transmission électronique (MET). L'analyse a montré la présence de dépôts de larges amas dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules HepG2 traitées avec ces nanoparticules d'argent. Dans le cytoplasme, les agglomérats de nanoAg ont été observés dans des compartiments ressemblant à des endosomes et des lysosomes.

Le niveau d'ions Ag⁺ dans la solution de particules d'argent nanostructurées a été déterminé après désionisation à l'aide d'une résine échangeuse d'ions et comparaison aux solutions initiales. Les résultats démontrent une très faible teneur en ions Ag⁺ libres dans les solutions initiales de nanoAg.

La cytotoxicité a été évaluée après traitement de 24 heures en utilisant 3 marqueurs : le test MTT (mesure de la fonction mitochondriale), le test au bleu Alamar et le test LDH (marqueur d'intégrité membranaire).

Une diminution significative de la réduction du MTT a été notée à des concentrations ≥ 3 µg/ml de particules de nanoAg (CI50 calculée 3,38 µg/ml) alors que la CI50 de AgNO₃ a été évaluée à 1,37 µg/ml soit environ 2,5 fois plus faible que celle des nanoAg, ce qui indique une cytotoxicité moins importante des nanoparticules d'Ag. En revanche, les CI50 estimées de AgNO₃ et des nanoAg d'après les tests au bleu Alamar et LDH ne montrent pas de différence significative. Toutefois, la CI50 estimée par la méthode LDH (0,53 µg/ml) est inférieure à celle calculée par MTT ce qui suggère que l'intégrité membranaire de la cellule est plus facilement affectée que les activités métaboliques mesurées.

En parallèle, l'addition d'un anti-oxydant, la N-acétyl cystéine (précurseur de la synthèse du glutathion) inhibe l'activité cytotoxique de AgNO₃ et des nanoAg ce qui tend à démontrer que le stress oxydant est fortement impliqué dans leur cytotoxicité.

L'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant, *i.e.* glutathion peroxydase 1 (GPx1), catalase et superoxyde dismutase (SOD), a été étudiée par la mesure des ARNm en RT-PCR après des traitements de 8 et 24 heures à la concentration de 0,2 µg/ml de nanoAg ou de AgNO₃ (≈ 10 % de la CI50). Si aucune diminution des niveaux d'expression des ARNm GPx1 n'a été notée pour les NanoAg, en revanche, ceux-ci se sont révélés 8 et 19 fois plus importants respectivement après 8 et 24 heures de traitement au AgNO₃. Le niveau d'expression des ARNm catalase des cellules HepG2 traitées au nanoAg augmente de 11 fois par rapport au témoin après 24 heures de traitement alors qu'il sont de 26 et 44 fois respectivement après 8 et 24 heures de traitement au AgNO₃ plus importants respectivement après 8 et 24 heures de traitement à l'AgNO₃. Enfin, les changements de niveaux d'expression des ARNm de SOD ne montrent pas de différence significative après traitement au nanoAg (4,5 fois /contrôle après 24 heures de traitement) ou à l'AgNO₃ (3,1 fois /contrôle après 8 heures de traitement).

En conclusion, les nanoparticules d'argent de diamètre < 10 nm utilisées au cours de cette étude ont montré une cytotoxicité *in vitro* sur les cellules HepG2, principalement liée au stress oxydant. Aucune différence significative entre l'activité cytotoxique des nanoAg (<10 nm) et celle des ions Ag n'a été observée à l'exception d'une toxicité moins importante des nanoAg / aux ions Ag dans le test MTT. L'expression des ARNm des gènes reliés au stress oxydant dans les cellules HepG2 après traitement avec des nanoAg ou AgNO₃ est régulée différemment ce qui suggère que la cytotoxicité des nanoAg est due à un effet intrinsèque, indépendant des ions Ag libres et, en conséquence, le mécanisme d'action des nanoAg peut être différent de celui des Ag.

Des résultats proches ont été obtenus par Cha *et al.* (Cha K., 2008) au cours d'essais *in vitro* sur une lignée cellulaire d'hépatome humain (Huh-7) traitée avec des nanoparticules d'argent de 13 nm ou des microparticules d'argent de 2 à 3,5 µm. L'activité mitochondriale et la production de glutathion ont été clairement modifiées.

Parallèlement, l'analyse histopathologique des foies des souris traitées pendant 3 jours avec ces mêmes particules d'argent a révélé une infiltration lymphocytaire aussi bien dans les foies provenant des animaux traités avec des nanoparticules que dans ceux des animaux traités avec des microparticules, ce qui suggère une induction d'inflammation. Ceci a été confirmé par l'analyse par biopuces de l'ARN qui a montré que l'expression de gènes liés à l'apoptose et à l'inflammation est modifiée. Ces changements de l'expression des gènes dans les foies des animaux traités avec des nanoparticules conduisent à des changements phénotypiques qui reflètent l'augmentation de l'apoptose et l'inflammation (Cha K., 2008).

E2- Conclusion sur le potentiel de génération de ROS/RNS, induction de stress oxydant et/ou de mécanismes inflammatoires

Globalement, les nanoparticules d'Ag induisent des modifications morphologiques cellulaires, un dysfonctionnement mitochondrial et une augmentation de la génération d'espèces réactives de l'oxygène d'une façon dose-dépendante et ce quelle que soit leur taille : 15 et 100 nm (Hussain S.M., 2005), 7-20 nm (Arora S., 2009; Hsin Y.H., 2008), 15 nm (Braydich-Stolle L., 2005; Carlson C., 2008), 6-20 nm (Asharani P.V., 2009) et < 10 nm (Kim S., 2009). Le stress oxydant contribue à la cytotoxicité de ces nanoparticules. Les nanoAg entraînent également un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose et/ou nécrose. L'apoptose survient à des concentrations faibles puis la nécrose apparaît. Il semble néanmoins que l'induction d'espèces réactives de l'oxygène diminue avec l'augmentation de la taille des nanoparticules (Carlson C., 2008). Il semble également que cellules primaires offrent une plus forte « résistance » au traitement par des nanoAg par rapport aux lignées secondaires (Arora S., 2009).

Par ailleurs, la présence d'agrégats à l'intérieur des mitochondries qui a clairement été démontrée est impliquée dans la toxicité mitochondriale et les lésions de l'ADN via la production d'ERO (Arora S., 2008 ; Asharani P.V., 2009).

En parallèle, une augmentation significative de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation a été notée en présence de nanoAg. Cet effet semble indépendant de la taille des nanoparticules d'Ag (Carlson C., 2008).

Caractéristiques des NanoAg (Taille/distribution Agglomération/ agrégation Forme Composition Surface spécifique Chimie de surface Charge de surface Solubilité/Dispersion)	Dispersion /Caractérisation	Modèles in vitro/ in vivo	Test de génotoxicité	Test de toxicité/ cytotoxicité/ autres	Doses/ Schéma de traitement	Localisation	Remarques	Conclusion/ Plus faible dose avec effet		Références
								Conclusion	Plus faible dose avec effet	
25 ± 7,1 nm coatées au polyvinylpyrrolidone	Distribution analysée par MET Aucune caractérisation après dispersion			Absorption cutanée : méthode <i>in vitro</i>				Absorption très faible : 0,0006 % peau intacte 0,003 % peau lésée	Plus faible dose avec effet	Filon FL et al, 2007 Larese FF et al. (2009)
52,7 – 70,9 nm	CMC à 0,5 % Aucune caractérisation après dispersion	Rats mâles et femelles Sprague-Dawley	Micronucleus sur moelle osseuse (OCDE 474)		30, 300 et 1000 mg/kg/jour pendant 28 jours		Très bonne exposition systémique des animaux	Aucune augmentation significative des MPCE		Kim YS et al. (2008)
6 - 20 nm enrobées d'amidon	Distribution analysée par MET	Cellules IMR-90 (fibroblastes de poumon humain) cellules U251 (glioblastomes humains)	Test des comètes Test micronucleus		48 heures de 25 à 400 µg/ml (test des comètes) 100 et 200 µg/ml (test du micronucleus)	Présence de nanoAg à l'intérieur des mitochondries (analyse par MET)	Traitement en milieu complet Test micronucleus avec Cyto B	Augmentation significative des comètes et de la fréquence des micronoyaux	25 µg/ml (test des comètes) 100 µg/ml (test du micronucleus)	AshaRani, PV. (2009)

	Aucune caractérisation après dispersion	Cellules HepG2	Mesure de la protéine g-H2AX	Contenu en ATP lésions mitochondriales production d'ERO Apoptose (annexine V)	24 heures de traitement	Présence de dépôts dans le cytoplasme (endosomes et lysosomes) et dans le noyau	Augmentation significative et dose-relée inhibée par la présence d'un anti-oxydant	diminution dose-dépendante pour les 2 cellules à partir de 48 h de traitement Apoptose entre 25-100 µg/ml			
5-10 nm sous forme de solution	Structure analysée par MET En solution initiale sphériques, bien dispersées Présence d'agglomérats de 100-300 nm après incubation dans le milieu de culture	Cellules HepG2	Mesure de la protéine g-H2AX	Contenu en ATP lésions mitochondriales production d'ERO Apoptose (annexine V)	24 heures de traitement	Présence de dépôts dans le cytoplasme (endosomes et lysosomes) et dans le noyau	Augmentation significative et dose-relée inhibée par la présence d'un anti-oxydant	diminution dose-dépendante pour les 2 cellules à partir de 48 h de traitement Apoptose entre 25-100 µg/ml			Kim S et al. (2009)
Caractéristiques des NanoAg (Taille/distribution Agglomération/ agrégation Forme Composition Surface spécifique Chimie de surface Charge de surface Solubilité/Dispersibilité)	Dispersion /Caractérisation	Modèles in vitro/ in vivo	Test de génotoxicité	Test de toxicité/ cyfotoxicité/ autres	Doses/ Schéma de traitement	Localisation	Remarques	Conclusion/ Plus faible dose avec effet	Conclusion	Plus faible dose avec effet	Références
5-10 nm	Structure analysée par MET En solution initiale sphériques, bien dispersées Présence d'agglomérats de 100-300 nm après incubation dans le milieu de culture	Cellules HepG2		MTT, bleu Alamar test LDH Formation d'ERO	24 heures de traitement	Présence de dépôts dans le cytoplasme (endosomes et lysosomes) et dans le noyau	Très faible teneur en Ag+ dans les solutions initiales nanoAg Comparaison avec cyfotoxicité de AgNO ₃	CI50 LDH = 0,53 µg/ml (AgNO ₃ = 1,37 µg/ml) MTT = 3,38 µg/ml Génération d'ERO ≥ 5µg/ml			Kim S et al. (2009) suite

25 nm non coatées ou coatées polysaccharidique	Aucune donnée de distribution Aucune caractérisation après dispersion	Cellules souche embryogénique de souris et fibroblastes embryogéniques de souris	Mesure de γ -H2AX et niveau de régulation Rad51	Régulation de la protéine p53 (contrôle du cycle cellulaire)	4 et 24 heures	NanoAg non coatés s'agglomèrent NanoAg coatés pas d'agglomérats distribués dans toute la cellule	Traitement en milieu de culture SANS sérum	augmentation de l'expression de γ -H2AX Sur-régulation de p53	Ahamed M et al. (2008)
				Apoptose (annexine V) MTT	24, 48 et 72 heures d'exposition à 50 μ g/ml		Cytotoxicité augmentée en fonction du temps (tox plus importante pour nanoAg coatés)		
15 nm 100 nm	Aucune donnée de distribution Aucune caractérisation après dispersion	Cellules BRL 3A (spermatogonie de type A de souris)		MTT, bleu Alamar test LDH Formation d'ERO	24 heures		Traitement en milieu de culture SANS sérum	Modif morpho Fuite de LDH Augment ERO = 24 μ g/ml Déplétion GSH Diminution potentiel membranaire mitochondrial	Hussain S et al. (2005)
Caractéristiques des NanoAg (Taille/distribution Agglomération/ agrégation Forme Composition Surface spécifique Chimie de surface Charge de surface Solubilité/Dispensibilité)	Dispersion /Caractérisation	Modèles in vitro/ in vivo	Test de génotoxicité	Test de toxicité/ cytotoxicité/ autres	Doses/ Schéma de traitement	Localisation	Remarques	Conclusion/ Plus faible dose avec effet	Références
								Conclusion	Plus faible dose avec effet

15 nm	Aucune donnée de distribution	Cellules C18-4 (spermatogonies de type A de souris)	MTS[a] (≈ MTT) test LDH Apoptose / nécrose Formation d'ERO	48 heures			- Modif cellulaires morpho, - fuite de LDH - diminution potentiel membranaire mitochondrial	CI50 <u>LDH</u> = 2,5 µg/ml <u>MTS[a]</u> = 8,75 µg/ml Apoptose / nécrose ≥ 5µg/ml	Braydich-Stolle et al. (2005)
	Aucune caractérisation après dispersion								
7-20 nm (sous forme de suspension aqueuse colloïdale)	> 90% ont un diamètre compris entre 7-20 nm (analyse par MET)	Cellules A431 (carcinome cutané humain) et cellules HT-1080 (fibrosarcome humain)	XTT (≈ MTT) test LDH déplétion GSH Apoptose (ladder)	24 heures	Etudes en MET Agrégats sphériques, noirs dans mitochondries (fibroblastes), dans mitochondries et des vacuoles (hépatocytes)	Apoptose cellules A431 : entre 1,56 et 6,25 µg/ml cellules HT-1080 entre 0,78 et 6,25 µg/ml	Modif morpho ↑ peroxydation lipidique ↑ ERO Déplétion GSH Diminution potentiel membranaire mitochondrial	A431 CI50 = 11,6 µg/ml (XTT) HT-1080 CI50 = 10,6 µg/ml (XTT) Fibroblastes CI50 = 61 µg/ml (XTT) Hépatocytes CI50 = 449 µg/ml (XTT)	Arora S et al. (2008)
	Aucune caractérisation après dispersion	Fibroblastes et hépatocytes de souris							
1-100 nm + comparaison à Ag (< 250 µm)	Analyse par MET	Cellules IH3T3 (fibroblastes de souris), A10 (muscle lisse de rat) HCT116 (humaines, tumeur cancéreuse de colon)	MTT Apoptose (annexine V) ERO	24 heures jusqu'à 72 heures pour Ag (< 250 µm)	Augmentation très rapide de [Ag] intracell Pour NIH3T3 à 50 µg/ml après 8 heures. Pour HCT116 à 100 µg/ml	Apoptose A431 à 50 µg/ml HCT116 > 100 µg/ml Associée au relargage de cytochrome c Ag : pas d'induction	NIH3T3 et A10 CI50 ≈ 50 µg/ml (MTT) HCT116 CI50 > 50 µg/ml Ag < 250 µm aucune toxicité à 50 µg/ml après 72 h		Hsin Y-H et al (2008)

Annexe 5 : Revue bibliographique de la toxicologie des silices amorphes nanostructurées

Introduction sur les silices amorphes de synthèse :

Les SAS (CAS 7631-86-9), toutes confondues, ont fait l'objet de très nombreuses études. Les données de synthèse présentées ci-après sont principalement extraites des documents suivants :

- JACC Document N° 51 (ECETOC,2006),
- SAS SI EPA Nano Submission, dossier de soumission volontaire à l'US EPA dans le cadre du NMSP (programme d'intendance pour les matériaux nanométriques, 2008).

Les études de toxicité présentées dans ces documents pour certaines très anciennes portent sur diverses SAS précipitées et/ou pyrogénées. En revanche, aucune de ces études ne portent spécifiquement sur le produit D.

Par ailleurs, il est important de préciser que pour l'ensemble de ces études, aucune caractérisation spécifique liée au caractère nanométrique des particules utilisées n'a été effectuée. Cela est discuté dans la partie conclusion. Par ailleurs, la littérature portant sur la silice **cristalline** et/ou sur des modèles exclusivement pulmonaires n'a pas été examinée.

A- Données de toxicologie générale

De nombreuses études de toxicité des SAS par différentes voies d'administration, après traitements aigus ou réitérés, sont fournies dans le JACC N° 51 (ECETOC,2006; US EPA, 2008). Un résumé est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Résumé des essais de toxicologie des SAS après traitements aigus ou réitérés (d'après ECETOC, 2006)

	SAS [7631-86-9]	NAS [1344-00-9]	CS [1344-95-2]
TOXICOLOGIE			
Toxicité orale aiguë	DL50 > 3300 mg/kg (test limite)	DL50 > 5000 mg/kg	DL50 > 5000 mg/kg
Toxicité aiguë par inhalation	CL50 > 0,14- > 2 mg/l (concentration maximale techniquement faisable)	Pas de données : analogie	Pas de données : analogie
Toxicité cutanée aiguë	DL50 > 5000 mg/kg (test limite)	DL50 > 5000 mg/kg	Pas de données : analogie
Irritations locales (cutanée, oculaire)	Non irritant	Non irritant	Pas de données : analogie
Sensibilisation	Pas de données	Pas de données	Pas de données
Toxicité à doses répétées	Réaction inflammatoire pulmonaire :	Pas de données : analogie	Pas de données : analogie

(par inhalation)	NOEL (5j) = 1 mg/m ³		
Toxicité à doses répétées (par inhalation)	Réaction inflammatoire pulmonaire (rat) : NOAEL (13 s) = 1,3 mg/m ³	Pas de données : analogie	Pas de données : analogie
Toxicité à doses répétées (par voie orale)	Pas d'anomalies liées à la substance chez le rat : NOAEL (6 mois) = 9000 mg/kg pc	Chronique : pas de données : analogie Pas de mortalité, pas de signes majeurs de toxicité chez le rat et la souris : NOAEL (14 j) > 5000 mg/kg pc	Pas de mortalité, pas de signes majeurs de toxicité chez le rat NOAEL (2 ans) ≅ 5000 mg/kg pc

A1- Toxicité aiguë

Les résultats de toxicité aiguë de diverses SAS précipitées et pyrogénées par voie orale chez le rat n'ont démontré aucune mortalité (période d'observation jusqu'à 28 jours). Aucun signe de toxicité n'a été mis en évidence jusqu'à la dose maximale de 5 000 mg/kg. Aucune anomalie macroscopique n'a été relevée après autopsie.

Concernant la toxicité aiguë par voie cutanée chez le lapin de diverses SAS précipitées (NB : aucune donnée sur des SAS pyrogénées), aucune mortalité et aucun signe de toxicité n'ont été observés jusqu'à la dose maximale de 5 000 mg/kg. Une légère rougeur a été notée sur peau intacte (sur peau abrasée, une rougeur accompagnée d'un gonflement ont été observés). Ces effets se sont révélés réversibles après quelques jours.

A2- Toxicités locales et sensibilisation

Des essais de toxicité locale ont été réalisés chez le lapin.

Les études d'irritation cutanée utilisant les protocoles standards n'ont révélées aucun signe d'irritation (œdème ou érythème) aux temps 1, 24, 48 et 72 heures après retrait des patchs occlusifs, aussi bien sur peau intacte que sur peau abrasée.

Il est à noter que des cas de sécheresse cutanée ou d'eczéma dégénératif ont été rapportés chez des travailleurs après des contacts répétés (OCDE, 2004).

De la même façon, aucun signe d'irritation oculaire (œdème ou érythème conjonctival, iris et cornée) après instillation unique chez le lapin n'a été observé après 1, 24, 48 et 72 heures.

Concernant les essais de sensibilisation cutanée, aucune donnée chez l'animal n'est disponible. Néanmoins, l'expérience chez l'homme semble confirmer que les SAS peuvent être considérées comme non sensibilisant cutané. Si des cas de sécheresse et d'irritation cutanée (friction) ont été notées, aucun cas d'allergie de contact n'a été rapporté (données recueillies au cours des 50 dernières années sur une population d'environ 400 travailleurs exposés aux SAS).

En conclusion, ces études évaluant les effets toxiques de différents types de SAS par administration orale chez le rat ont été conduites. Globalement, aucune mortalité et/ou signes de toxicité n'ont été notés pendant les périodes d'observation. Les examens macroscopiques n'ont révélé aucune anomalie au cours des autopsies. La mortalité survient à des niveaux de doses très élevés de 10 000 et 20 000 mg SiO₂/kg.

L'ensemble de ces résultats montrent qu'après des traitements aigus par voie orale (ou cutanée) à des doses élevées, les SAS testées n'ont induit aucune toxicité systémique.

Il est également important de souligner qu'aucune différence n'a été notée entre les valeurs de DL50 des différents types de SAS étudiés.

A3- Toxicité à doses répétées

Une étude de toxicité sub-chronique par voie orale réalisée sur une SAS pyrogénique (Cab-O-Sil) chez le rat traité pendant 13 semaines n'a montré aucun effet jusqu'à la dose maximale de 5 000 mg/kg/j (US EPA, 2008). Lors d'une étude similaire également chez le rat traité par voie orale pendant 13 semaines, la SAS précipitée testée (Sipernat 22) a induit une augmentation de la prise de nourriture associée à une augmentation du poids moyen absolu et relatif du cæcum à la dose maximale de 4 000 mg/kg/j. En revanche, les examens macroscopiques et microscopiques n'ont révélé aucune anomalie liée au traitement. La NOEL a été estimée à 4 000 mg/kg/j (US EPA, 2008). La conclusion de cette étude indique que l'absorption des silices amorphes par voie digestive semble limitée et la part non assimilée est éliminée directement dans les fèces et l'activité pro-inflammatoire observée avec des particules de silice de 100 et 200 nm reste transitoire.

L'effet toxique de particules de silice micrométrique (environ 30 µm) et nanométrique (30-90 nm, préparées par sonication et stabilisation des particules micrométriques) a également été étudié chez la souris. Des souris Balb/C et C57BL/6J ont été traitées pendant 10 semaines avec 1% de nanosilice ou 1 % de microsilice soit 10 g/kg/j dans l'alimentation. A la fin de cette période de traitement, les analyses sanguines biochimiques et hématologiques ont été effectuées. Aucune différence entre les groupes traités/non traités n'a été notée vis-à-vis des paramètres analysés à l'exception du taux d'alanine aminotransférase (ALAT) plus élevé pour le groupe traité avec les nanoparticules de silice par rapport aux groupes non traité ou traité avec la silice micrométrique. Parallèlement, la coloration hématoxyline/éosine a permis de confirmer l'atteinte hépatique avec une stéatose pour le groupe traité aux nanoparticules de silice alors que le contenu en Si dans le foie est quasiment identique quel que soit le groupe. Ces résultats suggèrent que les nanoparticules de silice ont un effet toxique sur le foie, même si aucune différence significative n'a été observée sur la santé pour une quantité totale ingérée sur 10 semaines de 140 g de silice / kg (So S.J., 2008).

A4- Toxicocinétique

Afin d'identifier les organes cible, la distribution tissulaire a été étudiée après administration(s) intraveineuse(s) sur différentes tailles de silice dans plusieurs publications :

Nishimori *et al.* (Nishimori H., 2009a) ont étudié la relation entre la taille des particules et leur toxicité en utilisant des particules de silice de différents diamètres, i.e. 70, 300 et 1000 nm (SP70, SP300, et SP1000). Pour évaluer la toxicité aiguë, une analyse histologique du foie, la rate, des reins et des poumons après administration unique par voie intraveineuse de ces particules de silice a été effectuée. Les nanoparticules SP70 ont induit des lésions du foie à 30 mg / kg de pc, tandis que SP300 ou 1000 n'ont eu aucun effet jusqu'à 100 mg/kg pc. L'administration de SP70 a entraîné une augmentation des marqueurs sériques d'atteinte hépatique, i.e. les aminotransférases sériques et des cytokines inflammatoires. Cet effet a été accompagné d'une relation dose-dépendante.

Ces observations confirment les résultats de l'étude de Cho *et al.* (Cho M., 2009) qui ont cherché à identifier la toxicité, la distribution tissulaire et les voies d'excrétion des nanoparticules de silice *in vivo*. Pour cette étude, des suspensions de nanoparticules de silice de 50, 100 et 200 nm marquées à un colorant fluorescent ont été utilisées. Ces nanoparticules ont montré une distribution de taille homogène et de forme sphérique et les images au microscope électronique à transmission ont montré que les diamètres des nanoparticules étaient bien d'environ 50, 100 et 200 nm.

Dans cette étude, les suspensions de nanoparticules ont également été injectées par voie intraveineuse à des souris. Les animaux ont été sacrifiés 12h, 24h, 48h, 72h et 7 jours après l'administration, le sang et les organes ont été prélevés et les urines et les fèces ont été collectés. Des foyers de cellules inflammatoires ont été observés dans le foie des animaux traités avec les nanoparticules, exclusivement au temps 12 heures après l'injection avec une incidence et une gravité de la réaction inflammatoire significativement augmentée pour les particules de 200 et 100 nm. En revanche, aucune réponse significative liée à l'injection de particules de 50 nm n'a été observée. Les particules de silice de 50, 100 et 200 nm sont éliminées par les voies urinaire et biliaire avec une concentration rénale maximale au temps 24 heures. Les nanoparticules de silice 50 nm sont excrétées plus rapidement (maximum au temps 12 heures après administration) et à des concentrations plus importantes que les nanoparticules de 100 nm (maximum au temps 12 heures après administration) et 200 nm. Les particules de 200 nm sont excrétées dans les urines et les fèces à des concentrations inférieures à celles retrouvées pour les nanoparticules de 50 et 100 nm. Quelle que soit leur taille, les nanoparticules de silice sont retrouvées sous forme d'agrégats dans le foie et la rate 4 semaines après une injection unique. Les macrophages jouent un rôle prépondérant et sont associés avec la distribution des nanoparticules de silice. L'activité pro-inflammatoire des particules de silice amorphes semble plutôt liée à leur surface spécifique comme l'ont également démontré Waters *et al.* (Waters K.M., 2009) sur des macrophages. Effectivement, ces auteurs ont démontré que la sécrétion de protéines inflammatoires induite par les particules de silice amorphe (non opsonisées) provoquant une activité cytotoxique, est précisément en corrélation directe avec la surface spécifique des particules, ceci sur une large gamme de diamètres (7-500 nm). L'analyse par microarray de la modification précoce de l'expression génique montre effectivement que, pour la majorité des gènes affectés, l'amplitude des changements est étroitement corrélée avec la surface spécifique des particules plutôt qu'à la masse ou au nombre de particules. En revanche, les processus biologiques mis en jeu par l'ensemble de ces changements d'expression génique sont quasiment identiques quel que soit le diamètre des particules. Toutefois, les mécanismes clés impliqués dans la régulation des gènes médiés par les nanoparticules de silice et leur cytotoxicité n'ont pas encore été établis. Globalement, ces résultats suggèrent que sur la base d'une surface spécifique équivalente, des modes d'action biologiques communs sont attendus pour les particules de silice de taille nano et supramétrique (Waters K.M., 2009).

Afin de consolider ces résultats de toxicocinétique, des souris BALB/c mâles ont été traitées par voie intraveineuse 2 fois/semaine pendant 4 semaines avec des nanoparticules de silice sphériques et non poreuses (Nishimori H., 2009b). Les mesures faites par zetasizer ont montré que le diamètre moyen des nanoparticules utilisées au cours de cette étude est de 55,7 nm. Elles ont été mises en suspension dans un milieu aqueux et leur dispersion a été confirmée par microscopie électronique. Aucune autre indication n'est donnée sur leur caractérisation.

L'analyse histologique des principaux organes (foie, rate, poumons, reins, cerveau et le cœur) a révélé une microgranulation hépatique et une accumulation splénique des mégacaryocytes chez les souris traitées alors que les reins, les poumons, le cerveau et le cœur sont restés inchangés. Le foie et la rate semblent être les principaux organes cibles de la toxicité par l'administration chronique de nanoparticules de silice (Nishimori H., 2009b).

B- Génotoxicité

Concernant le potentiel génotoxique, très peu de données sont actuellement disponibles. Le tableau ci-dessous résume les conclusions sur les études existantes (OCDE, 2004) :

Tableau 15 : Conclusion des essais de génotoxicité des SAS (d'après OCDE-SIDS, 2004)

	SAS [7631-86-9]	NAS [1344-00-9]	CS [1344-95-2]
GENOTOXICITE <i>IN VITRO</i>			
A	Test sur bactéries (mutation génique) Non mutagène	Pas de données : analogie	Non mutagène
B	Test sur cellules (mutation génique) Non mutagène	Pas de données : analogie	Pas de données : analogie
C	Test sur cellules (aberration chromosomique) Non mutagène	Pas de données : analogie	Non mutagène
GENOTOXICITE <i>IN VIVO</i>	Non mutagène	Pas de données : analogie	Non mutagène

B1- Génotoxicité *in vitro*

Les études *in vitro* présentées dans le document JACC51 (ECETOC, 2006) ont été effectuées sur des SAS pyrogénées et gel mais aucune ne porte sur des SAS précipitées.

Les tests réglementaires standard de génotoxicité *in vitro* disponibles sont :

- le test d'Ames (TG 471 Essai de mutation réverse sur des bactéries),
- le test de mutation sur cellules eucaryotes (TG 476 Essai *in vitro* de mutation génique sur des cellules de mammifères) et
- le test d'aberrations chromosomiques (TG 473 Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères).

Aucune activité mutagène *in vitro* n'a été mise en évidence au cours de ces essais.

Quelques rares études portant sur l'activité génotoxique des silices amorphes sont disponibles dans la littérature. Ces études soulignent l'importance de la taille des nanoparticules puisqu'il semble que des particules de taille > 200 nm ne parviennent pas à pénétrer dans le noyau, ne modifient pas la structure et les fonctions nucléaires et n'interfèrent pas avec l'expression génique (Chen M. et von Mikecz A., 2005).

Il existe peu de preuves démontrant clairement une activité génotoxique des nanoparticules de silice.

Certaines études récentes utilisant le test des comètes ont démontré que les nanoparticules de silice dont la taille varie de 20 à 400 nm n'induisent pas de génotoxicité significative :

La cytotoxicité et la génotoxicité des nanoparticules de silice luminescentes de diamètre 50 ± 3 nm mises en suspension dans un tampon PBS ont été étudiées vis-à-vis des cellules A549 qui sont des cellules épithéliales humaines de poumon (Jin Y., 2007).

Les objectifs de cette étude étaient d'analyser l'intégrité de l'ADN en utilisant des techniques spécifiques visant à détecter :

- les modifications de bases de l'ADN,

- les cassures de brins d'ADN,
- et l'augmentation de l'activité de réparation de l'ADN.

Des essais sur l'ADN génomique isolé directement exposé aux nanoparticules ont également été réalisés. L'ensemble des résultats montre l'absence d'effets toxiques importants liés aux nanoparticules de silice au niveau moléculaire et cellulaire à des concentrations < 0,1 mg / ml (Jin Y., 2007).

La génotoxicité de différentes silices nanoparticulaires commerciales a été évaluée en utilisant le test des comètes (fragmentation de l'ADN). La caractérisation approfondie des dispersions de nanoparticules, Les suspensions des nanoparticules de silice testées (2 nanoparticules Glantreo de diamètre 30 et 80 nm et 2 silices colloïdales Ludox de Sigma) ont été évaluées en termes de stabilité (dispersion/agrégation). La taille des nanoparticules a été évaluée par TEM (nanoparticules Glantreo de diamètre 30 et 80 nm = 33,21 nm et 34,89 nm ; 2 silices colloïdales Ludox = 21,32 et 30,51 nm).

Le test des comètes a été réalisé sur des fibroblastes de souris 3T3-L1 après 3, 6, et 24 heures de traitement avec les différentes nanoparticules de silice aux 2 concentrations de 4 et 40 µg/ml.

Aucune génotoxicité significative n'a été observée pour les nanoparticules testées dans ces conditions dans deux laboratoires distincts (Barnes C.A., 2008).

L'incorporation de nanoparticules de silice dans le noyau cellulaire a induit une accumulation aberrante de topoisomérase I dans le nucléoplasme (qui contient des protéines spécifiques du domaine nucléaire), et une agrégation de protéines telles que l'ubiquitine, le protéasome,... La formation d'agrégats de protéines intranucléaires (1) entraîne l'inhibition de la réplication, de la transcription, et de la prolifération cellulaire, (2) ne modifie pas significativement l'activité du protéasome ou la viabilité cellulaire, et (3) est réversible Chen M. et von Mikecz A., 2005).

B2- Génotoxicité *in vivo*

Les études *in vivo* disponibles présentées dans le document JACC51 (ECETOC, 2006) ont été effectuées exclusivement sur une SAS colloïdale, Syloid 244.

Les tests réglementaires de génotoxicité *in vivo* sur cette SAS gel sont :

- le test du micronucleus *in vivo* au niveau de la moelle osseuse de rat selon la ligne directrice OCDE 474 (Test de micronoyaux sur érythrocytes de mammifère) et
- le test du dominant létal chez le rat selon la ligne directrice OCDE 478 (Essai de mutation létale dominante chez le rongeur).

De plus, un test non standardisé, le « Host Mediated Assay », a également été réalisé. Dans ce test, les micro-organismes (dans ce cas levures et *Salmonella typhimurium*) sont injectés dans la cavité péritonéale des animaux préalablement traités et sont, par conséquent, exposés aux métabolites potentiellement mutagènes du produit testé.

B3- Conclusions sur la génotoxicité

Les tests effectués utilisant le plus souvent des méthodes standard n'ont mis en évidence aucune génotoxicité des SAS étudiées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Cependant, des remarques/critiques concernant ces études effectuées peuvent être formulées :

Concernant les tests réalisés *in vitro* :

Le test d'Ames n'apparaît pas judicieux quant à la mise en évidence d'une activité génotoxique des particules nanométriques. A ce jour, on ne dispose d'aucune preuve de pénétration des nanoparticules dans la bactérie et les comportements de la suspension nanoparticulaire avec le gel d'agar sont inconnus, *etc.*

Concernant les tests réalisés *in vivo* :

Tout d'abord, l'ensemble des études *in vivo* ont été effectuées sur la seule SAS colloïdale, i.e. Syloid 244. Aucun test réglementaire n'a été mené sur des SAS pyrogénées ou précipitées.

Les organes étudiés n'apparaissent pas pertinents au regard des essais de bio distribution disponibles dans la littérature qui ont permis de déterminer que les principaux organes cible sont le foie et la rate après des traitements uniques ou répétés (Cho M., 2009; Nishimori H., 2009a; Nishimori H., 2009b).

Ainsi, concernant précisément le test du micronucleus *in vivo*, même si la moelle osseuse constitue un organe systémique, ce choix n'apparaît pas pertinent puisqu'il n'est pas un organe cible. Au cours de cette étude, aucune preuve formelle d'exposition de la moelle osseuse n'a été fournie (aucune diminution du rapport PCE/NCE, absence de donnée concernant la concentration plasmatique). Etant donné les résultats obtenus lors des études de bio distribution, la génotoxicité devrait être évaluée au niveau du foie ainsi qu'au niveau d'un organe directement exposé tel qu'un organe du tractus digestif (estomac, duodénum, côlon).

De la même façon, le test du dominant létal chez le rat s'intéresse exclusivement aux mutations létales dominantes survenant au niveau des cellules germinales. C'est donc un test spécifique par rapport au tissu étudié, i.e. les cellules germinales, qui ne sont pas toujours les mieux exposées et qui ne représentent pas un organe cible majeur. Comme pour le test du micronucleus, aucune preuve formelle d'exposition des animaux n'est donnée.

Enfin, le test « host-mediated » n'est pas un test réglementaire. Il a été utilisé pour étudier la mutagenèse de produits après activation par les systèmes métaboliques *in vivo*. Les micro-organismes permettant de montrer une éventuelle activité mutagène sont en contact avec le(s) métabolite(s) mutagène(s) très peu de temps ce qui rend ce système d'essai peu sensible. De plus, comme précédemment, ce test utilise des bactéries qui ne semblent pas adaptées à la mise en évidence du potentiel génotoxique. Enfin, aucune preuve formelle d'exposition des animaux n'est fournie.

Néanmoins, il existe peu de preuves démontrant clairement que les nanoparticules de silice sont génotoxiques. Certaines études récentes utilisant le test des comètes a démontré que les nanoparticules de silice dont la taille varie de 20 à 400 nm n'induisent pas de génotoxicité significative (Barnes C.A., 2008; Jin Y., 2007). En revanche, Chen *et al.* ont montré que l'incorporation de nanoparticules de silice dans le noyau cellulaire a induit la formation d'agrégats de protéines intranucléaires qui a entraîné l'inhibition de la réplication, de la transcription, et de la prolifération cellulaire. Ces interférences d'ordre mécanique avec le fuseau mitotique et l'ADN ont déjà été identifiées comme mode d'action de particules micrométriques et des fibres telle que l'amiante (Chen M. et von Mikecz A., 2005). Du fait de leur gamme de taille nanométrique, il est communément admis que les NP sont capables d'interagir et éventuellement d'interférer avec des constituants cellulaires de dimension comparable tels que les nucléosomes, les microtubules, les filaments d'actine et les centrosomes. Ainsi, l'interférence avec ces structures peut mener à un dysfonctionnement de la division cellulaire et perturber le trafic cellulaire (Gonzalez L., 2008).

Ces études soulignent l'importance de la taille des nanoparticules puisque des particules > 200 nm ne parviennent pas à pénétrer dans le noyau, ne modifient pas la structure et les fonctions nucléaires et n'interfèrent pas avec l'expression génique (Chen M. et von Mikecz A.,2005).

C- Cancérogenèse - Reprotoxicité

Les conclusions des études de cancérogenèse et de toxicité pour le développement de SAS gel (Syloid 244) et précipitée, réalisées par voie orale chez différentes espèces, sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 16 : Résumé des essais de cancérogenèse et de reprotoxicité des SAS (d'après ECETOC, 2006)

	SAS [7631-86-9]	NAS [1344-00-9]	CS [1344-95-2]
Cancérogenèse			
Cancérogenèse (inhalation)	Résultats non concluants	Pas de données	Pas de données
Cancérogenèse (voie orale)	Non cancérogène chez le rat et la souris	Pas de données : analogie	Non cancérogène chez le rat
Cancérogenèse (intrapleurale)	Pas de données : analogie	Non cancérogène chez le rat	Pas de données : analogie
Reprotoxicité			
Toxicité pour la fertilité	Pas d'effet dans une étude limitée chez le rat	Pas de données : analogie	Pas de données : analogie
Toxicité pour le développement / Tératogenèse	Pas d'effets indésirables chez le rat, la souris, le lapin et le hamster	Pas d'effets indésirables chez le rat, la souris, le lapin et le hamster	Pas d'effets indésirables chez le rat, la souris et le hamster

Chez la souris B6C3F1, la SAS gel (Syloid 244) administrée dans l'alimentation pendant 21 mois à 0 - 1,25 - 2,5 ou 5% (40/sexe/groupe), aucune augmentation significative des lésions néoplasiques ou non néoplasiques n'a été observée dans les tissus examinés (système lymphatique, les poumons, le foie et les reins). Dans les mêmes conditions expérimentales, aucune augmentation significative des lésions néoplasiques ou non néoplasiques n'a été notée dans les tissus examinés des rats Fischer (système lymphatique, les poumons, le foie, les glandes surrénales, les testicules, la glande mammaire et prépuce).

Aucune tumeur maligne n'a été observée au cours d'une étude réalisée sur la SAS hydrophobe (Aérosil R972) chez le rat Wistar (20/sexe/groupe) exposés à 100 mg/kg/j via l'alimentation pendant 24 mois. Aucune différence dans le type et/ou dans le nombre de tumeurs bénignes par rapport aux contrôles. Aucune lésion sur d'autres organes n'a été signalée (ECETOC, 2006).

Dans toutes les études effectuées sur la SAS gel, aucune mortalité ou variation significative de gain de poids chez les mères traitées n'ont été retrouvées. Aucune différence significative entre le nombre de corps jaunes (mesuré chez le lapin seulement), le pourcentage d'implantation et / ou de

résorption et le poids des petits vivants n'a été notée par rapport aux contrôles. Le nombre d'anomalies externes, viscérales ou squelettiques des groupes traités ne diffère pas des contrôles (ECETOC, 2006).

L'étude sur SAS précipitée (Aérosil R972) a été effectuée sur rats Wistar femelles ayant reçu des doses quotidiennes de 500 mg SiO₂/kg pc dans l'alimentation pendant 8 ou 17 semaines avant l'accouplement avec des mâles (5 F / 1 M) ayant eux-mêmes été soumis à une exposition semblable pendant 4,5 mois. Le traitement a été poursuivi au cours de l'élevage. Les animaux de la génération F0 n'ont pas été affectés par le traitement quel que soit le paramètre considéré. Aucun effet relié au traitement au niveau de la taille de la portée ou du poids à la naissance. Aucune anomalie clinique, comportementale significative n'a été observée chez les petits à la naissance. Le développement de la descendance s'est révélé normal et aucune modification liée au traitement n'a été observée chez les petits de 4 semaines, pour les deux générations (ECETOC, 2006).

Aucune étude spécifique sur la toxicité pour la fertilité n'est disponible. On peut néanmoins souligner qu'aucun effet indésirable n'a été noté sur les organes reproducteurs des rats Wistar exposés oralement à cette même SAS (Aérosil R972) pendant 6 mois avec des doses contenues dans la nourriture de 0 ou 500 mg SiO₂/kg pc. En effet, à l'examen pathologique, aucun signe clinique ou observation macroscopique n'ont été observés et la comparaison du poids des organes (testicules et ovaires) entre les groupes témoin et traité n'a révélé aucune différence significative (JACC51).

Les SAS ont été considérées comme non toxiques pour la reproduction et non toxiques pour le développement (NOEL >> 1000 mg/kg/j).

En conclusion, les effets de certaines SAS sur la santé humaine, y compris la cancérogenèse, ont été examinés pour un certain nombre d'organismes et elles n'ont pas été classées comme cancérogènes ou dangereuses pour l'homme par le Centre International pour la Recherche sur le Cancer (CIRC). Les SAS ne sont pas toxiques pour le développement fœtal. La fertilité n'a pas été spécifiquement étudiée, mais les organes reproducteurs des études à long terme (études de toxicité chronique et de cancérogenèse) n'ont pas été affectés.

Tableau 17 : Etudes de toxicité pour le développement de 2 SAS (d'après ECETOC, 2006).

Type/ Nom du produit	Espèce, souche, nombre	Période d'exposition (Jour de gestation)	Dose (mg/kg pc/j)	Résultat	NOEL, toxicité maternelle et foétale (mg/kg pc/j)
Hydrophile					
Gel			Gavage		
Syloid 244	Rat, Wistar	6 - 15	0, 13.5, 62.7, 292, 1,350	Aucun effet	> 1 350
Syloid 244	Souris, CD 1	6 - 15	0, 13.5, 62.7, 292, 1,340	Aucun effet	> 1 340
Syloid 244	Lapin	6 - 18	0, 16, 74.3, 345, 1,600	Aucun effet	> 1 600
Syloid 244	Hamster doré	6 - 10	0, 16, 74.3, 345, 1,600	Aucun effet	> 1 600
Hydrophobe					
Pyrogénée			Nourriture		
Aérosil R972	Rat, Wistar	8 ou 17 semaines, puis accouplées avec des mâles exposés pendant 4,5 mois	0, 500	Aucun effet	> 500

C- Mécanisme inflammatoire / Potentiel de génération de ROS/RNS et induction de stress oxydant

Les réponses cellulaires induites par des nanoparticules de silice ont été évaluées dans de nombreuses études *in vitro*. Ces études se sont particulièrement intéressées à l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* sur plusieurs modèles cellulaires (de diverses origines), à la corrélation entre l'activité cytotoxique et à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), à l'atteinte mitochondriale, à l'induction d'apoptose, à la nécrose et à l'inflammation. Ces études à visée mécanistique ont en outre cherché à étudier les liens entre ces différents phénomènes et la taille des nanoparticules de silice.

C1 - Cytotoxicité / Potentiel de génération de ROS/RNS et induction de stress oxydant *in vitro* et *in vivo*

La toxicité des nanoparticules de SiO₂ de différentes tailles, 10-20, 40-50 et 90-110 nm, et de particules de Si micrométriques (45 µm) a été évaluée *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines de cerveau, de foie, d'estomac et de poumon. Il faut préciser qu'aucune caractérisation des nanoparticules utilisées au cours de cette étude n'a été réalisée. En présence de nanoparticules, l'activité mitochondriale a diminué jusqu'à 15%. Le contenu en ADN a diminué jusqu'à 20% alors que la production de glutathion a augmenté jusqu'à 15%. Aucun effet ne s'est révélé dose-relié. La perméabilité de la membrane plasmique n'a pas été altérée par la présence de nanoparticules. De plus, la cytotoxicité n'est pas modifiée du fait de la taille, la cytotoxicité de la silice micrométrique étant semblable à celle de la silice nanométrique (Cha et Myung, 2007).

La réponse de fibroblastes normaux et de plusieurs cellules tumorales à des doses variables de silice amorphe ou à des composites nanoparticulaires [silice – chitosan] a été évaluée en termes de cytotoxicité après traitement de 48 heures en utilisant 2 marqueurs : le test MTT et le test LDH (Cha et Myung, 2007).

Les différents types cellulaires utilisés ont été les suivants :

- WS1 : fibroblastes cutanés humains adhérents
- CCD-966sk : fibroblastes cutanés humains adhérents
- MRC-5 : fibroblastes pulmonaires humains adhérents
- A549 : cellules épithéliales adhérentes de carcinome pulmonaire humain
- MKN-28 : cellules épithéliales adhérentes d'adénocarcinome gastrique humain
- HT-29 : cellules épithéliales adhérentes d'adénocarcinome colorectal humain

Au cours de cette étude, les nanoparticules de silice ont été dispersées dans l'eau distillée par sonication. Une caractérisation de ces nanosilices dans l'excipient utilisé a été effectuée en termes de taille, de morphologie et d'état chimique. La taille moyenne des nanoparticules de silice analysée par SEM a été d'environ 22 nm (silicate) et de 80 nm (TEOS).

La CI20 (concentration inhibitrice 20%) de la silice telle que déterminée par la technique au MTT peut être classée dans l'ordre croissant suivant :

MRC-5 (138 to 155 µg/ml), WS1 (171 to 221 µg/ml), CCD (224 to 310 µg/ml), A549 (386 µg/ml), HT-29 (508 to 510 µg/ml) et MKN-28 (443 to 572 µg/ml).

Les lignées cellules cancéreuses (A549, HT-29 et MKN-28) ont donc une viabilité plus importante que les fibroblastes pulmonaires et cutanés (MRC-5, WS1 et CCD-966sk) lorsqu'elles sont incubées en présence de nanoparticules de silice.

Les nanoparticules de silice ont également induit des lésions membranaires (avec une libération de LDH de 5,6 à 11,3%) dans l'ordre croissant suivant :

WS1 (9,8 à 11,3%), CCD-966sk (8,7 à 9,1 %), MRC-5 (8,7 à 8,8 %), HT-29 (6,6 à 7,7 %), A549 (5,6 à 7,1 %) et MKN-28 (5,6 à 5,7 %).

La perte de l'intégrité membranaire étant l'une des caractéristiques physiologiques de la nécrose, le test LDH révèle qu'une exposition croissante à la silice induit une augmentation du nombre de cellules qui vont mourir via un processus nécrotique.

Par ailleurs, la cytotoxicité s'est révélée négligeable pour les cellules traitées avec des composites nanoparticulaires [silice – chitosan] (viabilité cellulaire >85% / témoin à 667 µg/ml) qui n'ont induit aucun effet toxique membranaire jusqu'à 667 µg/ml après 48 heures de traitement quel que soit le type cellulaire (libération de LDH >3,7 %).

En conclusion, l'essai de prolifération cellulaire indique que les nanoparticules de silice ne sont pas toxiques à des niveaux faibles de doses, mais que la viabilité cellulaire diminue à fortes doses. Un essai de détermination de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans les surnageants de culture indique que de fortes doses de silice induisent des lésions de la membrane cellulaire caractéristiques de la nécrose. Les deux tests révèlent que les fibroblastes ayant des temps de doublement longs sont plus sensibles aux dommages induits par une exposition à la silice que les cellules tumorales qui ont des temps de doublement plus courts. En revanche, les composites nanoparticulaires [silice – chitosan] induisent moins d'inhibition de la prolifération cellulaire et

moins de lésions membranaires. Cette étude suggère que la cytotoxicité de la silice pour les cellules humaines dépend fortement de leur activité métabolique (Cha et Myung, 2007).

Des nanoparticules de silice amorphe de différentes tailles ont été utilisées pour déterminer si les nanomatériaux sont capables d'inhiber la différenciation de cellules souches embryonnaires en cardiomyocytes spontanément excitables. Les distributions en termes de taille et les caractéristiques de dispersion des nanoparticules utilisées ont été déterminées avant et pendant l'incubation des cellules souches dans le milieu de culture par microscopie électronique à transmission (TEM) et par diffusion de la lumière en mode dynamique (qui permet de mesurer indirectement des tailles de particules en suspension). Les nanoparticules de silice ont été suspendues dans l'eau distillée. Les cellules souches embryonnaires de souris ont été exposées à des concentrations nanoparticules de silice allant de 1 à 100 µg/ml pendant une période de 10 jours (période de différenciation). L'activité cytotoxique a été déterminée après 24 heures et 10 jours d'exposition aux SiO₂ en utilisant le test standardisé WST-1 (proche du test MTT).

Concernant la caractérisation, toutes les nanoparticules de silice examinées par TEM se sont révélées sphériques et non agrégées, à l'exception des particules de 10 nm. Les diamètres mesurés pour les particules de 10 et 30 nm ont été respectivement de 11 et 34 nm. En revanche, les diamètres mesurés ont été de 34 et 248 nm pour les nanoparticules de diamètres théoriques 80 nm et 400 nm.

Le test a permis de démontrer une inhibition dose-dépendante de la différenciation des cellules souches en cardiomyocytes se contractant spontanément pour les 2 nanoparticules de silice testées de taille 10 (TEM 11) et 30 (TEM 34) nm avec des concentrations inhibitrices 50% (CI₅₀) de 59 et 29 µg/ml alors que les deux autres particules de taille 80 (TEM 34) et 400 (TEM 248) nm n'ont eu aucun effet jusqu'à la concentration maximale testée de 100 µg/ml (CI₅₀ > 100 µg/ml).

L'inhibition de la différenciation s'est produite à des concentrations non cytotoxiques ce qui indique un effet spécifique des particules sur la différenciation des cellules souches embryonnaires. Les auteurs concluent que l'atteinte de la différenciation de cellules souches par des nanoparticules largement utilisées nécessite des études approfondies sur le potentiel de ces nanoparticules à migrer dans l'utérus, le placenta et l'embryon afin de déterminer leurs effets possibles sur l'embryogenèse (Park M.V.D.Z., 2009). Le potentiel d'inhibition de la différenciation de cellules souches embryonnaires induite par ces nanoparticules de silice n'est pertinent que si leur translocation de la mère au fœtus à travers le placenta est effective.

Les effets cytotoxiques des nanoparticules de silice de 20 et 50 nm ont été étudiés sur des cellules HEK293 (cellules de reins embryonnaires humains en culture). La viabilité cellulaire, la fonction mitochondriale, la morphologie, les espèces réactives de l'oxygène (ERO), le contenu en glutathion (GSH), l'estimation de la peroxydation lipidique (quantification des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique), le cycle cellulaire et l'apoptose ont été évalués sur des cellules non traitées et des cellules exposées aux nanosilices. Les nanoparticules de silice ont été suspendues dans l'eau distillée. Aucune caractérisation n'a été effectuée.

L'exposition à SiO₂ nanoparticulaire de 20 et 50 nm à des doses comprises entre 20 et 100 µg/ml a entraîné une diminution de la viabilité cellulaire de façon dose-dépendante. La dose létale médiane après 24 heures d'exposition a été de 80,2 ± 6,4 et 140,3 ± 8,6 µg/ml respectivement pour les nanoparticules de 20 et de 50 nm SiO₂. L'examen morphologique a révélé un rétrécissement des cellules et de la condensation nucléaire après exposition aux nanoparticules de SiO₂. Une augmentation du niveau d'ERO intracellulaires et la réduction de la teneur en GSH ont également été observées dans les cellules HEK293 exposées aux nanoparticules de SiO₂. L'augmentation de la quantité de TBARS suggère un niveau élevé de la peroxydation lipidique. L'analyse par cytométrie en flux a montré que les nanoparticules de SiO₂ peuvent provoquer un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et une augmentation de la population cellulaire en sub-G1 apoptotique de façon dose-dépendante. Ces données suggèrent que l'exposition à des nanoparticules SiO₂ conduit à des modifications morphologiques cellulaires, un dysfonctionnement

mitochondrial et un stress oxydant (augmentation d'ERO intracellulaires et TBARS ainsi que la déplétion en glutathion) ce qui déclenche l'arrêt du cycle cellulaire puis l'apoptose d'une façon dose-dépendante. En conclusion, l'exposition de cellules HEK293 en culture à des nanoparticules de SiO₂ entraîne une cytotoxicité dose-dépendante associée à un stress oxydant accru (Wang F., 2009).

Le stress oxydant et les réponses inflammatoires induits par les nanoparticules de silice ont été évalués à la fois chez la souris et sur la lignée cellulaire RAW264.7.

Les nanoparticules de silice (taille moyenne de 12 nm) utilisées dans cette étude ont été fournies par Degussa Co. (Parsippany, NJ, USA). Selon les informations du fabricant, la pureté du SiO₂ est > à 99,8 % (impuretés en Al₂O₃, Fe₂O₃, TiO₂ respectivement < 0,05 %, 0,003 % et 0,03 %). Les suspensions de nanoparticules de silice ont été préparées dans le milieu de culture et dispersées pendant 20 minutes à l'aide d'un sonicateur.

Le traitement unique avec des nanoparticules de silice (50 mg/kg) par voie intrapéritonéale (ip) a conduit à l'activation des macrophages péritonéaux, à une augmentation du niveau sanguin d'IL-1 β et de TNF- α et à l'augmentation du niveau d'oxyde nitrique libéré à partir des macrophages péritonéaux. L'expression des ARNm de gènes liés à l'inflammation tels que IL-1, IL-6, TNF- α , iNOS et COX-2 se sont montrés élevés dans les macrophages péritonéaux en culture provenant de souris traitées. Lorsque la viabilité des splénocytes de souris traitées avec des nanoparticules de silice (50, 100 et 250 mg/kg, ip) a été mesurée, leur viabilité s'est révélée significativement diminuée pour les groupes traités aux doses les plus élevées (100 et 200 mg/kg ip). Cependant, la prolifération cellulaire a été démontrée dans le groupe traité avec la dose faible de 50 mg/kg ip sans cytotoxicité apparente. L'analyse en cytométrie en flux des sous-types de leucocytes au niveau de la rate des souris traitées a montré que les distributions des cellules NK et des cellules T ont augmenté pour atteindre respectivement 184,8% et 115,1% de la valeur du contrôle, alors que celle des cellules B a diminué à 87,7%. Pour déterminer le mécanisme pro-inflammatoire des nanoparticules de silice *in vivo*, une étude *in vitro* a été effectuée en utilisant la lignée cellulaire RAW 264.7 qui dérive de macrophages péritonéaux de souris. Le traitement cellules RAW264.7 avec des nanoparticules de silice a conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) accompagnée d'une diminution du GSH intracellulaire. Parallèlement à la génération d'ERO, les nanoparticules de silice ont également augmenté le niveau d'oxyde nitrique libéré. Ces résultats suggèrent que les nanoparticules de silice génèrent des ERO qui peuvent déclencher des réponses pro-inflammatoires aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Park et Park, 2009).

Le rapport de l'IRSST (IRSST, 2008) mentionne également 2 études qui se sont intéressées à l'étude de phénomènes cellulaires se manifestant par l'induction de divers mécanismes ou par la production de médiateurs de l'inflammation :

- l'étude *in vitro* de Lucarelli *et al.* (Lucarelli M., 2004) qui a confirmé que les nanoparticules de SiO₂ présentaient une activité pro-inflammatoire significative sur l'activité des macrophages humains en induisant sélectivement la production de cytokines inflammatoires IL-1 β and TNF- α ,
- l'étude de Peters *et al.* (Peters K., 2004) qui a étudié le comportement et la viabilité de cellules endothéliales humaines *in vivo*. Ces auteurs ont observé que les NP de PVC, de TiO₂, de SiO₂ et de Co étaient vacuolisées dans les cellules. Les nanoparticules de Co ont démontré un potentiel pro-inflammatoire et cytotoxique important, alors que celles de SiO₂ avaient un potentiel pro-inflammatoire faible et celles de TiO₂ un potentiel encore moindre, mais observable, en dépit du fait que cette substance est souvent considérée comme biologiquement amorphe. La conclusion de ces auteurs est que si une stimulation pro-inflammatoire des cellules endothéliales se produit *in vivo*, une inflammation chronique pourrait en être une des conséquences possibles.

C2- Conclusion sur le potentiel de génération de ROS/RNS, induction de stress oxydant et/ou de mécanismes inflammatoires

Les données concernant l'induction de stress oxydant et des réponses pro-inflammatoires pour les nanoparticules de silice amorphe sont peu nombreuses comparativement à celles de la silice cristalline.

Le traitement unique avec des nanoparticules de silice (50 mg/kg) par voie intrapéritonéale (ip) a conduit à l'activation des macrophages péritonéaux, à une augmentation du niveau sanguin d'IL-1 β et de TNF- α et à l'augmentation du niveau d'oxyde nitrique libéré à partir des macrophages péritonéaux. L'expression des ARNm de gènes liés à l'inflammation tels que IL-1, IL-6, TNF- α , iNOS et COX-2 se sont montrés élevés dans les macrophages péritonéaux en culture provenant de souris traitées. Lorsque la viabilité des splénocytes de souris traitées avec des nanoparticules de silice (50, 100 et 250 mg/kg, ip) a été mesurée, leur viabilité s'est révélée significativement diminuée pour les groupes traités aux doses les plus élevées (100 et 200 mg/kg ip). Cependant, la prolifération cellulaire a été démontrée dans le groupe traité avec la dose faible de 50 mg/kg ip sans cytotoxicité apparente. L'analyse en cytométrie en flux des sous-types de leucocytes au niveau de la rate des souris traitées a montré que les distributions des cellules NK et des cellules T ont augmenté pour atteindre respectivement 184,8% et 115,1% de la valeur du contrôle, alors que celle des cellules B a diminué à 87,7%. Pour déterminer le mécanisme pro-inflammatoire des nanoparticules de silice *in vivo*, une étude *in vitro* a été effectuée en utilisant la lignée cellulaire RAW 264.7 qui dérive de macrophages péritonéaux de souris. Le traitement cellules RAW264.7 avec des nanoparticules de silice a conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) accompagnée d'une diminution du GSH intracellulaire. Parallèlement à la génération d'ERO, les nanoparticules de silice ont également augmenté le niveau d'oxyde nitrique libéré. Ces résultats suggèrent que les nanoparticules de silice génèrent des ERO qui peuvent déclencher des réponses pro-inflammatoires aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Park et Park, 2009).

Étant donné que les nanoparticules de silice peuvent entraîner une augmentation du niveau d'ERO (Lin W., 2006) et du fait que le radical hydroxyle est une molécule extrêmement réactive, la production de $\cdot\text{OH}$ proche de l'ADN pourrait facilement conduire à l'induction de cassure des brins d'ADN et à la formation de bases oxydées (Singh N., 2009). Les nanoparticules de silice ont également une incidence sur l'intégrité nucléaire en formant des agrégats au niveau de protéines intranucléaires qui peuvent conduire à l'inhibition de la réplication, de la transcription, et de la prolifération cellulaire (Chen M. et von Mikecz A., 2005).

Annexe 6 : Tableau de synthèse (écotoxicologie)

NPs	Caractéristique	Expo et Caractérisation	Origine de la NP	Espèce(s) Modèle utilisé	Test utilisé	Resultat	Référence
TiO ₂	25-70nm C: 640 mg/l	Expo : 6,24 et 48 mg/l	Sigma Aldrich	Microalgue (<i>Pseudokirchnerella subcapitata</i>)	Test OCDE (201) Inhibition de la croissance algale	Bulk TiO ₂ : EC50 :35,9 mg/l Nanoformulations: EC50: 5,83mg/l NOEC: Bulk :10,1 mg/l et nano: 0.98 mg/l Formation d'agrégats de nano TiO ₂ piégeant les cellules algales et expliquant la toxicité.	Aruoja et al. 2009-09-14 <i>Science of the total Environment</i>
TiO ₂	25-70nm		Sigma Aldrich	Bacteria assay <i>V. fischeri</i> Crustacean assay <i>(D. magna, T. platyrus)</i>	Toxicity and growth inhibition Mortality endpoint	TiO ₂ : non toxique même à 20 g/l EC50>20000 LC50 =20000	Heinlaan et al., 2008 <i>Chemosphère</i>
*Ag TiO ₂	20-30nm 30nm	Tableau 1	Quantum sphere NovaCentri x Degussa	<i>D. pulex</i> <i>Zebra fish</i> Algues	Toxicité des NP vs métaux solubles Bioassays	LC50 Ag 40 µg/l Cu 60 µg/L TiO ₂ : pas de toxicité Organismes filtreurs plus sensibles que les poissons Forme nano moins toxique que la forme soluble	Griffitt et al 2008 <i>Env Toxicol Chem</i>
TiO ₂	<25nm anatase	Taille des agrégats 20-100 nm, moyenne : 100 nm	Sigma Aldrich	<i>D. pulex</i>	Toxicité aiguë Stress oxydant biomarqueurs protéiques	Toxique à des doses> 500ppm GST, augmentation à 500 ppm TiO ₂	Klaper et al 2009 <i>Environ Pollut</i>

TiO ₂ SiO ₂	TiO ₂ : 66nm, 950 nm (anatase/rutile) SiO ₂ : 14nm, 930 nm	Dans la suspension: TiO ₂ : 66nm ; 175-810 nm, moy: 330 nm 950nm ; 240-460 nm, moy : 320 nm Testé à 50-5000 ppm SiO ₂ : 14nm ; 135-510 nm, moy : 205nm 930 nm ; 380-605 nm, moy : 480 nm	Sigma Aldrich	<i>E. Coli</i> <i>B. subtilis</i>	Inhibition de la croissance	Tableau 2 <i>B. subtilis</i> : effet à partir de 1000ppm <i>E. coli</i> : effet à partir de 500ppm	Adams et al 2006 <i>Water Research</i>	Catalase augmentation à 100ppm Diminution des protéines à 100 ppm TiO ₂	
*TiO ₂	Tableau 1 Anatase	TiO ₂ : 24, 47.9, 95.9, 167.8, 239.6 mg/l Tableau 1	Hongchen Material (China) Bulk form Acros Fisher scientific	Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	Léthalité Longueur des vers Nombre d'œufs et progéniture par ver	Effets toxique LC50: 79.9 mg/l nano, 135.8 mg/l bulk Effet sur la croissance et le nombre d'œufs	Wang et al 2009- <i>Environ Pollut</i>		
*TiO ₂	Taille: 21nm Aire: 50±15m ² G ⁻¹ Concentration 0.1, 0.5, 1.0mg/L; Durée: 14 days	Très bonne dispersion Vérification de l'expo	De Gussa AG, Lawrence Industries	<i>O. mykiss</i>		stress oxydant Induction de défenses anti-oxydantes pathologies branchiales pas de perturbations hématologiques diminution ATPase Na/Kdépendante	Federici et al 2007 <i>Aquat Toxicol</i>		
TiO ₂	<100 nm		Sigma Aldrich	Plusieurs espèces	Bioessais toxicité	Les seuils de toxicité dépendent des espèces utilisées (Tableau 2)	Blaise et al 2008 <i>Environ Toxicol</i>		
TiO ₂	10-20 nm	30 nm (filtered)		<i>D. magna</i>	Test de toxicité aigue (USEPA)	Filtré: augmentation mortalité en augmentant	Lovern and Klaper, 2006 <i>Environ Toxicol</i>		

		100-500 nm (sonicated)				2024) (0.2, 1, 2, 5, 6, 8, 10 ppm) LOEC, NOEC	la dose sonication: mortalité variée	and Chemistry
*TiO ₂	Diamètre moyen 30 nm Concentrations correspondant aux LOEC	(30 nm) (2,0 ppm) 48h expo	Alfa Aesar	<i>D. magna</i>	Behaviour (video: heart rate, and postabdominal curling rate, feeding rate by full rotation of thoracic leg)	Pas de changement dans les sauts de fréquence Diminution (pas significative) de la fréquence cardiaque) Pas d'impact sur les mouvements recherchés de nourriture	Lovorn et al 2007 <i>Environ Sci Technol</i>	
TiO ₂	Produit 1: 25 nm, forme cristalline: anatase Produit 2 : 100 nm 100% anatase			Algue (<i>Desmodesmus subspicatus</i>) Crustacé (<i>D. magna</i>)	Test OCDE, ISO Test inhibition croissance (algue) Test immobilisation (crustacé)	La toxicité dépend de la nature de la NP Activité photocatalytique se maintient après irradiation	Hund-Rinke and Simon <i>Environ Sci & Pollut Research</i>	
TiO ₂ +Cd	21nm Surface: 50m ² /g		De Gussa	<i>Carp C. carpio</i>	Adsorption du Cd sur les nanoparticules de TiO ₂ Accumulation du Cd	Forte capacité d'adsorption du Cd sur TiO ₂ NP TiO ₂ augmente l'accumulation du Cd	Zhang et al 2007 <i>Chemosphere</i>	
*TiO ₂ ,	140nm Particules enveloppées (Al +- Si)	Table 2	DuPont	Mammifères Bactéries Organismes aquatiques	Bioessays Tests OCDE Toxicité/génotoxicité	Faible à moyenne toxicité	Warheit et al 2007 <i>Toxicol letters</i>	
TiO ₂	Taille: 15nm Surface: 190 à 290m ² /G (p 1908) anatase	Exposition par la nourriture 0,5-3 000 µg/g agglomérats	Sigma Aldrich	<i>P. scaber</i>	Exposition à court terme par la voie alimentaire (3j) Poids Alimentation survie	Les réponses (stress oxydant) ne sont pas dose-dépendantes (p.1908) Pas d'effet à haut niveau d'org biol à la plus forte dose	Jemec et al 2008 <i>Environ Toxicol Chem</i>	
*TiO ₂	<25nm 10nm (small) 145	Exposition par la nourriture -100 µgG nourriture	Sigma Aldrich	<i>P. scaber</i>	Stress oxydant (GST, Cat taux	Stress oxydant : importance de la durée/concentration de	Drobne et al 2009 (<i>Environ Pollut</i>)	

	m2/g 40nm (large) m2/g	3 or 14 jours Table 1			d'alimentation, mortalité, modification de la masse	l'exposition	
TiO ₂	5nm Anatase	0,1-1 000 µg/L (cytotox) 1-100 µg/L(génotox) TiO ₂ seul ou combine avec UVA	Sigma Aldrich	Goldfish cells skin	Cytotoxic and genotoxic effects	Radical Hydroxyl induit par TiO ₂ Accentué par une irradiation UVA	Reeves et al 2008 <i>Mutation research</i>
TiO ₂	75%rutile 25%anatase taille 21 nm	Dans l'eau : bonne dispersion 24,4 nm en moyenne Conc : 0,5-50 µg/ml	deGussa AG	Cellules poisson : mykiss	Genotoxicité/cytot oxicité ± UVA	Pas de (géo)toxicité significative sauf en présence d'irradiation UVA	Vevers et Jha 2008 Ecotoxicology
TiO ₂ SiO ₂	7 et 20 nm 7 et 10 nm	1 mg/l TiO ₂ : 7 nm: 300.81 m ² /g 20 nm: 66,6 m ² /g SiO ₂ : 10 nm: 644,44 m ² /g SiO ₂ : 7 nm: 349.7 m ² /g	Sigma Aldrich	<i>D. magna</i> <i>C. riparius</i>	Test OCDE	Pas d'effet génotoxique	Lee et al 2009-09-17 Environ Pharmacol Toxicol
*Ag	(Table 1)	Table 2	Sigma Aldrich	Concombre laitue Microtox	Test de germination Bioluminescent test	Faible (voire zero) toxicité Seulement perturbations qqes	Barrena et al 2009-07- 10 <i>Chemosphere</i>

*Ag		10-200 nm, moy: 40 nm	NanoSys GmbH	Algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	photosynthèse	Concentration AgNP18 fois – toxique que AgNO ₃ Concentration Ag+ toxicité AgNP>AgNO ₃	Navarro et al 2008 <i>Environ Sci Technol</i>
SiO ₂	363 et 521gSiO ₂ /l Surface: 236 et 135 m ² /g		Silica LUDOX LS, LUDOX TM40 Sigma Aldrich	Algue verte (<i>P. subcapitata</i>)	Test OCDE (201) Inhibition de la croissance algale	Importance de la surface et non la masse	Van Hoecke et al 2008 <i>Environ Toxicol Chem</i>
TiO ₂	TiO ₂ sous forme nano ou non, enveloppé ou non Nano : 50 sur 10 nm (enveloppé) 20-30 nm (non enveloppé)	Trois eaux de surface (diff origines) Nano : 0,01-100 mg/l Taille : cf table 4	Produits BASF : TLite SF, TLite SF-S et TLite max (différents coatings)	<i>Daphnia magna</i>	Tests OCDE de toxicité (tox et reprotox)	6 tests faiblement positifs pour nTiO ₂ Toxicité indépendante de taille, coating, milieu	Wiensch et al, 2009 <i>Chemosphere</i>
TiO ₂	10, 30 et 300 nm 288, 47 et 11,5 m ² /g	0,6-250 mg/l Taille moyenne ds milieu : 1261 nm 416 nm 492 nm	10 nm : Frederiksen (Danemark) 30 et 300 nm : Sachtleben Chemie GmbH	Algues verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inhibition croissance		Hartmann et al, 2009 <i>Toxicology (in press)</i>
TiO ₂	25-70 nm	625-20 000 mg/l	Sigma Aldrich	Levure <i>S. cerevisiae</i>	Inhibition croissance Diminution de colonies viables	Pas de toxicité même à 20 g/l EC50 > 20 000 mg/l	Kasemets et al, 2009 <i>Toxicology in vitro</i>

Annexe 7 : Liste des critères OCDE pour les essais de nanomatériaux

Cette annexe correspond à une traduction fidèle d'un extrait du document ENV/JM(2008)13 du groupe de travail WPMN (Working Party on Manufactured Nanomaterials) disponible sur le site internet de l'OCDE⁶¹.

Ensemble de base minimale

Liste de critères

Informations sur le nanomatériau / identification

- Nom (à partir de la liste de nanomatériaux)
- Numéro CAS
- Formule structurale / structure moléculaire
- Composition du nanomatériau testé (notamment degré de pureté, impuretés connues ou additifs)
- Morphologie de base
- Description de la chimie de surface (revêtement ou modification, par exemple)
- Principales utilisations commerciales
- Activité catalytique connue
- Méthode de production (précipitation, phase gazeuse, par exemple)

Propriétés physico-chimiques et caractérisation du matériau

- Agglomération / agrégation
- Solubilité dans l'eau
- Phase cristalline
- Pulvérulence
- Taille des cristallites
- Image(s) représentative(s) obtenue(s) par microscopie électronique à transmission
- Distribution des particules par taille
- Surface spécifique
- Potentiel zêta (charge de surface)
- Chimie de surface (s'il y a lieu)
- Activité photocatalytique
- Densité brute (coulabilité)
- Porosité
- Coefficient de partage octanol-eau, s'il y a lieu
- Potentiel de réduction-oxydation
- Potentiel de formation de radicaux
- Autres informations pertinentes (lorsqu'elles existent)

Devenir dans l'environnement

- Stabilité de la dispersion dans l'eau
- Dégradabilité biotique
- Biodégradabilité facile
- Essai de simulation sur la dégradation ultime dans les eaux de surface
- Essai de simulation pour les sols
- Essai de simulation pour les sédiments
- Essai de simulation pour les eaux usées
- Identification du (des) produit(s) de dégradation
- Autres essais concernant le (les) produit(s) de dégradation si nécessaire
- Dégradabilité abiotique et devenir
- Hydrolyse, pour les nanomatériaux à surface modifiée
- Adsorption - désorption

⁶¹ [http://www.oilis.oecd.org/oilis/2008doc.nsf/LinkTo/NT00003282/\\$FILE/JT03246895.pdf](http://www.oilis.oecd.org/oilis/2008doc.nsf/LinkTo/NT00003282/$FILE/JT03246895.pdf)

- Adsorption dans les sols ou les sédiments
- Potentiel de bioaccumulation
- Autres informations pertinentes (lorsqu'elles existent)

Toxicologie environnementale

- Effets sur les espèces pélagiques (à court terme / à long terme)
- Effets sur les espèces sédimentaires (à court terme / à long terme)
- Effets sur les espèces pédologiques (à court terme / à long terme)
- Effets sur les espèces terrestres
- Effets sur les microorganismes
- Autres informations pertinentes (lorsqu'elles existent)

Toxicologie pour les mammifères

- Pharmacocinétique (ADME)
- Toxicité aiguë
- Toxicité à doses répétées

Dans la limite des informations disponibles :

- Toxicité chronique
- Toxicité pour la reproduction
- Toxicité pour le développement
- Toxicité génétique
- Expérience acquise concernant l'exposition humaine
- Autres données d'essai pertinentes

Sûreté du matériau

Dans la limite des informations disponibles :

- Inflammabilité
- Explosivité
- Incompatibilité