

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 13 février 2015

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à l'expertise concernant la mise à jour des connaissances sur « l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent »

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 10 août 2011 par la Direction générale de la santé (DGS), la Direction générale du travail (DGT) ainsi que la Direction générale de l'alimentation (DGAL), la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) afin de mettre à jour les connaissances sur l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Les nanoparticules d'argent sous forme agrégée, agglomérée ou encore colloïdale, sont utilisées dans un grand nombre d'applications industrielles, notamment dans les secteurs suivants :

- alimentation : les additifs, emballages alimentaires et revêtements internes de réfrigérateurs ;
- textiles : vêtements et literie ;
- produits cosmétiques et d'hygiène : brosses à dents, fers à lisser les cheveux, *sprays* désinfectants, etc.

L'intégration de ces nanoparticules d'argent dans des articles commercialisés par les industriels est réputée répondre principalement à des finalités antibactériennes et antifongiques. Il n'existe cependant actuellement aucun inventaire complet des produits contenant des nanoparticules d'argent dans le monde ou en France. L'institution américaine *Woodrow Wilson International Center for Scholars* révèle cependant, dans son inventaire des nano-produits¹, que depuis 2011, les produits de consommation contenant des nanoparticules d'argent seraient les plus abondants parmi l'ensemble des nano-produits mis sur le marché et que leur nombre est en croissance.

¹ <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>

L'entrée en vigueur, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-8 du Code de l'environnement (loi Grenelle II du 12 juillet 2010), de la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire a permis de dresser un premier état des connaissances de l'identité, des usages et des quantités de nanomatériaux produits, importés et distribués en France². Il souligne la présence de tonnages importants de nanomatériaux sur le marché français. Cependant, cet état des lieux met en évidence l'absence de déclaration concernant la production, l'importation ou la distribution de nanoparticules d'argent, alors même que des produits de consommation contenant de telles nanoparticules sont identifiés sur le marché français (cf. avis et rapport Anses 2010)³.

En ce qui concerne les connaissances sur les risques liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent, l'institut fédéral allemand d'évaluation des risques (*Bundesinstitut für Risikobewertung* - BfR) et l'Anses avaient conclu dans leurs rapports respectifs de décembre 2009⁴ et de mars 2009 et 2010⁵ que les données disponibles étaient insuffisantes pour permettre une évaluation quantitative des risques sanitaires.

Dans son avis du 28 décembre 2009, le BfR a cependant recommandé aux industriels de renoncer à l'utilisation d'argent ou de composés d'argent à l'échelle nanométrique dans les produits alimentaires et les produits de consommation courante. L'Anses, quant à elle, compte tenu notamment des connaissances sur la toxicité de certaines nanoparticules d'argent et de risques de contamination des compartiments environnementaux, a préconisé dans son avis du 17 mars 2010 de limiter l'exposition des consommateurs aux produits contenant des nanomatériaux et leur dissémination dans l'environnement, selon une approche graduelle :

- « en favorisant les produits sûrs et équivalents en termes de fonction, d'efficacité et de coût dépourvus de nanomatériaux ;
- en restreignant le recours aux produits dont l'utilité démontrée serait faible pour les consommateurs, par exemple sur la base d'une analyse socio-économique de type bénéfice/risque ;
- en restreignant le recours aux produits susceptibles de libérer des nanomatériaux 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 ;
- en limitant dès aujourd'hui aux usages essentiels le recours aux nanomatériaux pour lesquels des alertes de danger ont été identifiées ».

Compte tenu des recommandations différentes exprimées par l'Anses et le BfR dans leurs avis respectifs, l'Anses a été saisie le 10 août 2011 par la Direction générale de la santé (DGS), la Direction générale du travail (DGT) ainsi que la Direction générale de l'alimentation (DGAL), la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) afin de mettre à jour les connaissances sur l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent.

² http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_public_format_final_20131125.pdf.

³ Anses (2010) Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement. Anses, Maisons-Alfort.

⁴ L'avis du BfR Nr. 024/2010 a été rendu le 28 décembre 2009, et confirmé par un communiqué de presse sur le site du BfR le 10 juin 2010. Le BfR a organisé par la suite un atelier réunissant les différentes parties prenantes intéressées (experts scientifiques, associations, industriels) afin de discuter des risques connus et des options envisageables pour mettre en place une protection adéquate des consommateurs. À l'issue de cette réunion, le président du BfR a maintenu la position de son agence (12 avril 2011).

⁵ L'Anses a publié deux rapports sur l'évaluation des risques des nanomatériaux impliquant les nanoparticules d'argent : « Nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale » (mars 2009) et « Nanomatériaux et produits de consommation » (mars 2010).

La demande d'expertise a porté dans un premier temps sur l'analyse des différences éventuelles, sur le plan bibliographique, entre le rapport du BfR et ceux de l'Anses publiés en 2009 et 2010. Ce travail a fait l'objet d'un rapport d'analyse bibliographique remis aux demandeurs, en s'appuyant sur le système de veille de l'Anses pour la thématique des nanotechnologies, soumis pour relecture et complété par quatre experts rapporteurs externes. Au cours de ce travail d'analyse bibliographique et méthodologique, l'Agence a identifié un certain nombre de publications relatives notamment à la toxicité des nanoparticules d'argent, postérieures à la publication des derniers rapports d'expertise.

À la lumière de ces connaissances nouvelles, la seconde phase de l'expertise a été engagée, afin de mettre à jour les travaux d'expertise de l'Agence sur le nano-argent, en considérant notamment les avis et recommandations publiés par des instances d'expertise nationale ou internationale, y compris en milieu de travail. Les travaux ont été menés dans le cadre d'une expertise collective spécifique réalisée avec l'appui du groupe de travail « Nanomatériaux et santé – alimentation, environnement, travail » rattaché au Comité d'experts spécialisés « agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements ».

La mise à jour des connaissances s'est appuyée sur une revue bibliographique de la littérature relative aux nanoparticules d'argent publiée entre décembre 2009 et décembre 2013 ou portant sur de nouvelles voies d'exposition, en tenant compte des résultats précédemment décrits dans le rapport publié par l'Agence en 2010.

Les travaux scientifiques retenus dans ce nouveau rapport sont donc issus :

- de publications dans des revues scientifiques internationales avec comité de lecture ;
- de rapports d'études scientifiques, d'organismes et d'organisations non gouvernementales (avis du Scenih⁶, rapport du Beuc et de l'Anec⁷, etc.).

Compte tenu de l'abondance des publications sur le sujet, une sélection des articles fournissant des résultats originaux a été effectuée par les experts du GT. Les articles pour lesquels la caractérisation de l'argent sous toutes ses formes a été jugée insuffisante ont été exclus. C'est ainsi que 280 articles scientifiques portant sur la toxicité et l'écotoxicité des nanoparticules d'argent ont été identifiés et analysés sur la période 2009-2013.

Le domaine « activité bactérienne et bactériorésistance » a été inclus dans cette expertise et couvert par une recherche bibliographique spécifique.

Un chapitre du rapport d'expertise a été consacré à l'identification des sources d'exposition des consommateurs et de l'environnement, à partir de l'inventaire des nano-produits réalisé par l'Anses dans le cadre du rapport « Nanomatériaux et produits de consommation » (2010) et de l'inventaire du *Woodrow Wilson International Center for Scholars*. La liste non exhaustive réalisée par l'Observatoire régional des déchets industriels en Midi-Pyrénées en 2009 (Ordimp)⁸ a permis également de compléter le recensement des produits de consommation contenant des nanoparticules d'argent présents en France.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

⁶ Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, Scenih⁶ (2010) Scientific Basis for the Definition of the Term "nanomaterial", European Commission, Brussels, Belgium.

⁷ Bureau européen des unions de consommateurs et Association Européenne pour la coordination de la représentation des consommateurs auprès de la standardisation, ANEC and BEUC, (2012) Nano : Very Small and Everywhere, URL : http://www.anec.eu/attachments/ANEC_BEUC%20nano-silver%20brochure%20updated.pdf

⁸ Les nanoparticules dans les déchets : un chantier à ouvrir. « Le savoir : un préalable à la gestion » (ORDIMIP, octobre 2009)

L'Anses a confié au Comité d'experts spécialisé (CES) « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » l'instruction de cette saisine. Ce dernier a, dans un premier temps, mandaté quatre experts rapporteurs pour réaliser une analyse comparée des différences bibliographiques entre le rapport du BfR et ceux de l'Anses.

L'Agence a, par la suite, mandaté le groupe de travail (GT) « Nanomatériaux et santé – alimentation, environnement, travail » pour réaliser une mise à jour de l'évaluation des risques liés au nano-argent. Pour ce qui concerne l'activité antibactérienne et la bactériorésistance, le groupe de travail s'est appuyé sur l'expertise de deux scientifiques de l'Anses, spécialistes du domaine.

Ces travaux d'expertise ont été soumis régulièrement au CES « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements », tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre le 16 septembre 2011 et le 20 juin 2014⁹. Le rapport final produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES. Les travaux d'expertise ont également fait l'objet d'une présentation auprès du CES « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » le 10 juillet 2014.

L'Anses a analysé les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques via le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

Résultat de l'expertise collective

Le comité d'experts spécialisé « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » a adopté les travaux d'expertise collective du groupe de travail « Nanomatériaux et santé – alimentation, environnement, travail » ainsi que ses conclusions et recommandations, lors de sa séance du 20 juin 2014 et a fait part de cette adoption à la direction générale de l'Anses.

Conclusions de l'expertise collective

■ Préambule

Le CES reprend ci-dessous les conclusions générales et les recommandations formulées par le groupe de travail dans son rapport d'expertise, en les complétant le cas échéant.

L'usage du terme « nano-argent », c'est-à-dire l'argent à l'état nanoparticulaire, s'inscrit dans le sillage de la plupart des réglementations en vigueur encore aujourd'hui, pour lesquelles seule compte la composition chimique de la substance générique. On retrouve en réalité sous le vocable « nano-argent » des nanoparticules potentiellement très différentes, qui se distinguent notamment par leur distribution en taille, leur morphologie, leur traitement¹⁰ ou fonctionnalisation de surface.

Des travaux antérieurs, en particulier ceux menés au sein du groupe de travail sur les nanomatériaux manufacturés de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE)¹¹ ou encore du comité technique « Nanotechnologies » de l'Organisation internationale de

⁹ Réunions du CES « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » :

- 16/09/2011 : présentation de la saisine et organisation
- 20/03/2012 validation de la comparaison bibliographique
- 21/03/2013, 08/06/2013, 24/09/2013, 13/01/2014 : état d'avancement des travaux d'expertise
- 28/03/2014, 14/05/2014 : présentation et validation du rapport du GT par le CES
- 20/06/2014 : validation de l'expertise collective par le CES.

¹⁰ Par exemple par une étape de sablage ou de purification.

¹¹ WPMN : *Working party on manufactured nanomaterials* – OCDE.

normalisation (ISO¹²-TC229), démontrent que la réactivité chimique et biologique des nanoparticules est fonction d'un ensemble de paramètres physico-chimiques les caractérisant (et pas uniquement de leur composition chimique) et des interactions avec leur environnement.

Ces considérations ont conduit le groupe de travail à rappeler qu'il est impossible d'aboutir à une conclusion unique et généralisable à l'ensemble des nanoparticules d'argent pour ce qui concerne leur identification, l'évaluation de leur dangerosité, leur activité antibactérienne et les possibles phénomènes de bactériorésistance, quelles que soient leurs applications envisagées ou existantes. En effet, l'hétérogénéité des résultats publiés sur tous ces points s'explique en premier lieu par les différences portant sur les caractéristiques physico-chimiques des diverses nanoparticules d'argent étudiées mais aussi par les défauts méthodologiques des tests utilisés.

Enfin, le groupe de travail souligne que l'utilisation de l'argent sous toutes ses formes (ionique, nanoparticulaire, massique, etc.) est revendiquée principalement pour son activité antimicrobienne. Par activité antimicrobienne, il faut comprendre soit un effet inhibiteur de croissance des micro-organismes, soit un effet létal vis-à-vis de ces micro-organismes, les bactéries étant le plus souvent citées. En conséquence, l'emploi de l'argent pour ce type d'applications antibactériennes peut entraîner l'apparition de phénomènes de bactériorésistance et avoir un impact négatif sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème. Cette activité antibactérienne et ses possibles conséquences doivent donc être nécessairement prises en compte dans le cadre de l'évaluation des risques liés aux nanoparticules d'argent.

Bien que le nombre d'études scientifiques portant sur l'évaluation des effets biologiques et des expositions liés aux nanoparticules d'argent ait fortement augmenté, le CES rappelle qu'en l'état actuel des connaissances il n'est toujours pas possible d'évaluer les risques liés aux nanoparticules d'argent et leurs usages.

■ Exposition

L'évaluation des connaissances disponibles sur les effets induits par les nanoparticules d'argent sur la santé et l'environnement doit nécessairement être associée à une évaluation des sources et des conditions d'exposition de l'homme et de son environnement. Il convient notamment de déterminer précisément quelles sont les sources d'exposition potentielles des populations (travailleurs, consommateurs, riverains de sites industriels, etc.) et de l'environnement, afin de considérer non seulement les voies d'exposition humaine aux nanoparticules d'argent les plus probables (voie cutanée, respiratoire ou orale), mais aussi d'estimer les doses (nombre, masse, surface, pourcentage ionique) auxquelles les populations concernées et l'environnement pourraient être concrètement exposés, tout au long du cycle de vie des différents produits contenant des nanoparticules d'argent.

Depuis le 1^{er} janvier 2013, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-8 du Code de l'environnement, est entrée en vigueur la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire fabriquées, importées ou distribuées sur le territoire français. Sur le plan de l'exposition professionnelle, l'analyse du bilan de la première année de mise en œuvre de la déclaration obligatoire indique que les nanoparticules d'argent ne seraient ni fabriquées, ni importées, ni distribuées à des utilisateurs professionnels sur le territoire français, excepté pour des activités de recherche et développement, portant alors sur une quantité totale inférieure à 1 kg.

D'autres inventaires¹³ mentionnent pourtant leur présence dans des produits de consommation. Cet usage est également rapporté par la consultation des sites internet d'entreprises qui distribuent leurs produits sur le territoire national¹⁴. En l'absence de sources de données fiables permettant d'évaluer l'exposition, les experts sont contraints, comme cela a été fait dans le rapport de l'Anses publié en 2010, d'estimer cette dernière sur la base de *scenarii* plus ou moins réalistes ou d'extrapoler à partir de cas théoriques. S'ils permettent de mieux comprendre les risques

¹² ISO : International Standardization Organization.

¹³ Voir le chapitre 4 du présent rapport.

¹⁴ Voir le paragraphe 4.2 du présent rapport.

éventuels liés aux nanoparticules d'argent, de tels *scenarii* ne permettent toutefois pas de mener des évaluations quantitatives des risques réalistes.

Le CES souligne que la base de données issue de la déclaration obligatoire des nanomatériaux (<https://www.r-nano.fr/>) constitue une première étape importante pour connaître l'exposition, en particulier professionnelle, aux nanomatériaux. Aussi, le CES recommande d'améliorer les modalités de déclaration afin de mieux identifier la présence de nanoparticules d'argent importées, produites et distribuées sur le territoire national.

■ **Caractérisation physico-chimique**

L'analyse des articles scientifiques publiés postérieurement à ceux pris en compte lors du précédent rapport de l'Anses (2010) permet de constater que la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent utilisées est réalisée aujourd'hui de façon plus systématique et de manière plus pertinente. L'intégration de plusieurs méthodes de mesures accompagnées d'informations assurant la traçabilité des mesures, notamment, aboutit à l'obtention de données plus robustes. Certains articles rapportent également des mesures réalisées afin d'étudier la stabilité temporelle des suspensions, la vitesse de dissolution et la teneur en ions argent (Ag^+) au cours du temps dans des substrats représentatifs des milieux de culture cellulaires des tests *in vitro*. Cependant, encore trop peu d'études s'intéressent aux variations des paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent dans les tests *in vitro* et *in vivo*.

Des progrès en matière de caractérisation physico-chimique sont donc notés dans la littérature scientifique, mais il subsiste encore des lacunes, notamment concernant les données de dissolution des nanoparticules (et donc sur la teneur en Ag^+ ou encore sur la spéciation de l'argent)¹⁵.

Malgré ces progrès, la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent dans les sources d'exposition et dans les matrices complexes demeure difficile, en raison :

- du nombre limité de méthodes permettant cette caractérisation, de leur complexité de mise en œuvre, de leur difficulté d'accès (synchrotron) et de leur coût ;
- du manque de méthodes de mesures standardisées ainsi que de matériaux de référence à l'échelle nanométrique, certifiés ou non (MRC ou MR) ;
- des lacunes dans la connaissance de la stabilité des paramètres physico-chimiques (en particulier dissolution, spéciation et état d'agglomération) en fonction du milieu (présence d'ions, de protéines, de dispersants, etc.) et de leur évolution dans le temps ;
- ainsi que des lacunes dans la connaissance du cycle de vie de ces nanoparticules d'argent.

■ **Toxicologie - effets sur la santé**

Depuis 2010, de nombreux articles ont été publiés sur l'évaluation de la toxicité et de la génotoxicité *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules d'argent, rapportant des résultats pour la plupart contradictoires, ce qui rend l'estimation de la dangerosité de ces nanoparticules encore difficile à ce jour.

Les études de biodistribution menées chez le rongeur et le lapin ont permis de mettre en évidence une accumulation préférentielle dans le foie, la rate, les reins et les poumons, quelle que soit la voie d'administration - avec des niveaux plus élevés chez les femelles que chez les mâles pour les reins.

¹⁵ La solubilisation s'entend ici comme celle utilisée couramment en chimie, qui correspond à la formation de paires d'ions en solution aqueuse. Par dispersion, on entend la formation d'une solution colloïdale de nanoparticules, invisible à l'œil nu. Cette définition est différente de celle proposée par l'UPAC.

Certaines publications relatives à des expérimentations *in vivo* (exposition aux nanoparticules d'argent) soulignent le passage d'argent de forme indéterminée (ionique ou nanoparticulaire) à travers les barrières hémato-encéphalique, placentaire ou encore hémato-testiculaire. Toutefois, les mécanismes ne sont pas élucidés, notamment par manque d'expérimentations *in vitro* ou *ex vivo*.

Des expositions aiguës¹⁶ ou sub-chroniques¹⁷ chez les petits rongeurs et le lapin ont entraîné peu d'effets cliniques ou comportementaux, quelle que soit la voie d'exposition utilisée. Néanmoins, des effets¹⁸ sont rapportés au niveau des organes primo-exposés (poumons, intestin) ou des organes systémiques (foie, rate et reins essentiellement).

Il est difficile d'estimer le potentiel reprotoxique et tératogène des nanoparticules d'argent, compte tenu du peu d'études disponibles sur animaux, bien que des effets à différents niveaux de la fonction de reproduction (production de gamètes, puberté, etc.) aient été observés. Chez le rongeur, il semble que les nanoparticules d'argent ne provoquent pas d'altérations morphologiques des embryons, mais un effet sur leur implantation et sur leur viabilité ne peut être exclu. Par ailleurs, l'accumulation d'argent observée dans différents organes des fœtus mériterait une attention particulière.

De même, les résultats de neurotoxicité chez le rongeur sont clairs et montrent *in vivo* des effets moteurs et des effets sur la mémoire qui restent cependant contradictoires. Aussi, compte tenu du passage potentiel des nanoparticules d'argent au travers des barrières hémato-encéphalique et sang/liquide cérébrospinal (sang-LCS) et de leur bioaccumulation, des effets toxiques au niveau du système nerveux central ne peuvent être exclus.

De manière générale, les mécanismes impliqués dans la toxicité et la génotoxicité des nanoparticules d'argent concernent le déséquilibre de la balance oxydo-réduction (stress oxydant) et l'inflammation.

Il n'est en général pas possible d'établir une courbe dose-réponse pour les effets rapportés, ce qui rend délicate l'interprétation des données toxicologiques.

En l'état des connaissances, les incohérences constatées peuvent s'expliquer par :

- des différences dans les expérimentations réalisées, concernant par exemple le type de nanoparticule d'argent (taille, revêtement), le type cellulaire utilisé, l'absorption cellulaire, la dissolution intracellulaire, le paramètre de toxicité étudié, la façon dont les cellules ou les animaux ont été exposés, etc. ;
- l'utilisation de protocoles très variables en matière de voies d'administration (intrapéritonéale, intraveineuse...), de doses administrées et d'espèces testées (drosophile, rats ...).

Enfin, bien que la présence d'argent ait été observée dans différents organes en fonction des voies d'administration, la forme sous laquelle cet argent est présent n'est pas établie. Il n'est pas non plus clairement établi si les effets observés lors de certains tests *in vitro* et *in vivo* sont exclusivement dus aux ions Ag^+ ou à la forme nanoparticulaire, voire éventuellement aux effets combinés entre les ions Ag^+ et les nanoparticules d'argent.

■ Écotoxicologie

Depuis 2009, le nombre de travaux en écotoxicologie et leur qualité ont progressé. En particulier, la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent est réalisée de façon plus systématique et plus approfondie, et les études en milieux complexes commencent à se

¹⁶ Aiguë : une seule dose de 0,1 à 5 000 mg/kg.

¹⁷ Sub-chronique : 4 à 13 semaines, $\leq$ 500 mg/kg.

¹⁸ Pour les données sub-chroniques : diminution de la masse corporelle et de la masse de certains organes, des variations de paramètres biochimiques au niveau sanguin, des alopecies etc.

développer par le biais d'études conduites en mésocosme, en plein air ou en laboratoire (eau douce).

Ces études récentes montrent que les nanoparticules d'argent sont bioaccumulées et qu'elles induisent des effets biologiques dans tous les organismes aquatiques et terrestres étudiés. Cependant, de nombreuses interrogations demeurent à propos de la localisation de ces nanoparticules dans les organismes (tissus, cellules) et du mécanisme d'action toxique, en particulier en ce qui concerne la contribution de la forme ionique ou de la forme nanoparticulaire dans la toxicité. Ces incertitudes sont en partie dues à l'insuffisance des données disponibles sur le devenir et le comportement des nanoparticules d'argent dans l'environnement (influence des facteurs biotiques et abiotiques) au cours du temps. De plus, il existe toujours, à l'heure actuelle, une méconnaissance sur le transfert trophique des nanoparticules d'argent.

■ **Activité antibactérienne et résistance**

L'étude de l'activité antibactérienne et de la résistance bactérienne n'avait pas fait l'objet d'une analyse spécifique dans la précédente expertise de l'Anses en 2010. Elle a été abordée par le groupe de travail à travers des données publiées pour la plupart postérieurement à 2009, et en utilisant l'analyse de la littérature scientifique publiée par le BfR¹⁹ en 2009.

Comme en toxicologie et en écotoxicologie, il faut souligner que le défaut de mesures ou d'informations précises sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent étudiées induit des biais quant à l'interprétation et à la comparaison des résultats des études portant sur l'activité antimicrobienne.

Concernant le mode d'action antibactérien des nanoparticules d'argent, des travaux en laboratoire ont permis de mettre en évidence une différence d'activité antibactérienne de l'ion argent par rapport à celle des nanoparticules d'argent. Cependant, il convient de souligner l'absence de travaux de recherche ciblés visant à étudier les mécanismes permettant d'expliquer cette différence.

Du fait de l'influence de la complexité et de la diversité des milieux naturels sur la stabilité des différentes espèces de l'argent, il est à ce stade impossible de distinguer la contribution respective des nanoparticules d'argent et de l'ion argent dans cette activité antibactérienne.

La capacité d'adaptation des bactéries à l'ion argent monovalent et les résistances croisées à certains antibiotiques ont été démontrées en laboratoire depuis de nombreuses années. Cependant, il n'est toujours pas possible de tirer de conclusions quant aux risques de propagation de cette résistance en conditions réelles. En effet, les études menées en milieux naturels sont encore trop peu nombreuses et aboutissent à des conclusions souvent contradictoires. Les travaux épidémiologiques permettant d'évaluer la prévalence des gènes de résistance à l'argent parmi les populations bactériennes font cependant défaut.

Recommandations du CES

Le CES souligne l'insuffisance des connaissances permettant d'évaluer les risques liés aux nanoparticules d'argent et à leurs utilisations. Ce constat illustre les nombreuses difficultés à réaliser une évaluation de risque des nanomatériaux, exposées dans le rapport de l'Anses récemment publié²⁰. Aussi, face à une croissance soutenue de la mise sur le marché de produits intégrant des nanomatériaux, le CES reprend les recommandations exprimées par l'Agence dans son avis du 15 avril 2014 visant à un encadrement réglementaire renforcé pour les nanomatériaux et à la poursuite d'efforts de recherche portant sur la caractérisation physico-chimique, la connaissance des expositions et la dangerosité. Ces efforts permettraient de pouvoir établir une catégorisation des nanomatériaux en s'appuyant sur des approches alternatives (*safer by design*,

¹⁹BfR : Institut fédéral allemand d'évaluation des risques (*Bundesinstitut für Risikobewertung*).

²⁰ Anses - Évaluation des risques liés aux nanomatériaux : Enjeux et mise à jour des connaissances. Rapport d'expertise collective – 2014.

QNAR, arbres décisionnels en fonction des étapes du cycle de vie, etc.) pour réduire le nombre d'études à réaliser au cas par cas lors de l'évaluation des risques.

Le succès aux appels à projets relatifs au développement des nanomatériaux pourrait être subordonné à l'intégration systématique d'études de toxicologie et d'écotoxicologie. Le CES encourage une coordination efficace et renforcée en ce qui concerne l'initiation, la sélection et la gestion des appels à projet, sans oublier un effort en matière de formation à la recherche. Un plan national de recherche tel que celui initié pour les perturbateurs endocriniens serait nécessaire.

Concernant spécifiquement les nanoparticules d'argent, le CES émet les recommandations listées ci-dessous.

Dans le domaine de la caractérisation physico-chimique

Considérant en particulier :

- le fait que la réactivité des nanoparticules d'argent dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques ;
- le fait que les paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent ne sont pas nécessairement tous des paramètres intrinsèques des nanoparticules, mais sont dépendants du milieu d'exposition ainsi que du cycle de vie des nanoparticules d'argent ;

le CES recommande :

- de recourir systématiquement à une combinaison de plusieurs méthodes de caractérisation physico-chimique afin d'obtenir une connaissance aussi complète et fiable que possible des propriétés physico-chimiques des nanoparticules d'argent auxquelles sont exposés la population générale ou salariée ainsi que l'environnement ;
- de développer et d'utiliser des nanomatériaux de référence pour étalonner périodiquement les appareils de mesure et de s'assurer de la traçabilité métrologique des mesures. Cette étape est indispensable pour fiabiliser les mesures et les rendre comparables entre différentes techniques, différents laboratoires ou différents utilisateurs ;
- de favoriser le développement de méthodes de mesures des paramètres physico-chimiques en milieux complexes ;
- de caractériser les nanoparticules d'argent dans les modèles utilisés pour les tests (éco)toxicologiques, afin de comprendre le devenir et le comportement des nanoparticules d'argent diffusées dans l'environnement ;
- d'apporter une attention particulière à la stabilité ou à l'évolution de ces paramètres physico-chimiques dans les milieux réels d'exposition (en présence ou en l'absence des cellules lors des tests *in vitro*, ou en présence d'organismes lors des études écotoxicologiques notamment) ;
- d'établir des protocoles de référence d'échantillonnage afin de pouvoir comparer les études entre elles ;
- d'utiliser, de manière systématique, des méthodes de caractérisation de la dissolution des nanoparticules d'argent (et de la spéciation éventuelle) dans les études afin de progresser dans la compréhension des mécanismes d'action des nanoparticules d'argent vs les ions Ag^+ .

Dans le domaine de l'exposition

Considérant

- les lacunes et les difficultés persistantes concernant l'évaluation des expositions de la population générale et des travailleurs, notamment :
 - o la connaissance des sources d'exposition aux nanoparticules d'argent ;
 - o la traçabilité des mesures et de leurs incertitudes ;

- o les conditions de prélèvement et d'échantillonnage des produits testés ;
- o les connaissances relatives à la traçabilité de ces produits dans les milieux concernés ;

le CES recommande :

- d'améliorer ou de développer des méthodes :
 - o de caractérisation des nanoparticules d'argent et de leurs suspensions *in situ* (fluides biologiques, matrices complexes, etc.) ;
 - o de mesure permettant de déterminer les doses réelles auxquelles sont exposés les consommateurs et les professionnels ;
- de développer et d'utiliser des matériaux de référence pour étalonner les appareils de mesure de l'exposition aux nanomatériaux ;
- de poursuivre et renforcer la documentation des émissions de nanoparticules d'argent et des expositions réelles des travailleurs, des consommateurs et des riverains.

Dans le domaine de la toxicologie

Considérant :

- l'hétérogénéité des résultats scientifiques publiés ;
- le fait que la réactivité des nanoparticules d'argent dépende notamment de leur environnement (cellule, polymère, dispersants, ions, etc.) ;
- la possibilité d'un franchissement des barrières physiologiques ;
- la possibilité de bioaccumulation dans des organes cibles ;
- le manque de données d'excrétion dans les études de toxicocinétique ;
- la possibilité de formation d'espèces réactives de l'oxygène pouvant provoquer des effets toxiques (cytotoxicité, génotoxicité, inflammation, apoptose, nécrose) ;
- l'impossibilité de statuer, en l'état actuel des connaissances, sur les effets reprotoxiques, neurotoxiques et génotoxiques des nanoparticules d'argent ;
- l'absence d'étude de cancérogénèse ;
- les faiblesses méthodologiques de l'unique étude toxicologique réalisée chez l'homme²¹ ;

le CES recommande :

- de procéder à une caractérisation physico-chimique complète et systématique (avant et au cours des tests toxicologiques) et de développer des travaux portant sur l'étude des modifications de la suspension des nanoparticules d'argent une fois introduites dans un milieu complexe ou un organisme ;
- de réaliser des études de toxicocinétique complètes (incluant les mesures d'excrétion), qui devraient être préalables à toute étude *in vitro* ou *in vivo*²² ;
- de renseigner systématiquement le *design* des expérimentations et de détailler leur mise en œuvre :
 - o en sélectionnant le modèle cellulaire ou l'espèce animale et le(s) paramètres(s) étudiés, afin d'être prédictif ;
 - o en s'assurant de la pertinence des doses et des durées de traitement utilisées afin d'éviter d'engendrer des résultats non spécifiques, peu ou non prédictifs d'une activité *in vivo*, les rendant finalement inutilisables pour caractériser les dangers ;
 - o en utilisant de préférence une voie d'exposition représentative d'une exposition humaine possible *in vivo* ;

²¹ Munger *et al.*, 2014, cf. paragraphe « toxicité humaine du présent rapport d'expertise.

²² Les résultats de toxicocinétique obtenus permettent de définir les organes cibles, les lignées cellulaires pertinentes et les doses.

- o en évaluant différents événements génétiques pouvant mener à des phénomènes génotoxiques et/ou mutagènes tout en s'affranchissant d'éventuelles interférences dans les tests (colorants, réactifs, etc.) ;
- o en discriminant les effets générés par les nanoparticules d'argent avec ceux produits par les ions Ag^+ ;
- d'évaluer l'influence des paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent, tels que la taille ou la dissolution des nanoparticules d'argent, sur leur durée de rétention et leur clairance ;
- de poursuivre les études de toxicité en général, en insistant sur les études chroniques et sub-chroniques ;
- de développer des méthodologies de référence et des méthodes standardisées permettant d'évaluer la dangerosité des nanoparticules d'argent liée à leurs usages ;
- d'approfondir les études concernant les franchissements de barrières biologiques (peau, placenta, hémato-encéphalique, etc.) ;
- de développer les études de neurotoxicité et reprotoxicité, compte tenu notamment du danger potentiel d'une présence d'argent (quelle que soit sa forme) au niveau du système nerveux central ou des organes de la reproduction.

Avant d'envisager d'éventuelles études de cancérogénèse, il serait nécessaire de :

- o consolider les études de génotoxicité *in vivo*, en particulier en utilisant des modèles et des conditions expérimentales appropriées ;
- o de vérifier l'absence de modification épigénétique²³.

Dans le domaine de l'écotoxicologie

Considérant :

- le nombre élevé de publications scientifiques ;
- l'hétérogénéité des résultats publiés, notamment en ce qui concerne les approches expérimentales ;
- la dépendance de la réactivité des nanoparticules d'argent vis-à-vis de leur environnement (présence de cellules, de polymères, de dispersants, d'ions, etc.) ;
- les résultats sur la biodisponibilité et la bioaccumulation des nanoparticules d'argent ;
- les effets biologiques constatés chez tous les organismes aquatiques et terrestres étudiés aux doses testées ;

le CES recommande :

- de poursuivre des études d'écotoxicologie en milieux complexes, notamment afin de prendre en compte l'impact du milieu environnemental sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent et notamment sur leur spéciation ;
- de conduire des études dans des conditions se rapprochant le plus de celles auxquelles le milieu environnemental est susceptible d'être soumis hors situation accidentelle (e.g. concentrations et durée d'exposition) ;
- de poursuivre les études visant à localiser les nanoparticules d'argent dans les organismes (organes, cellules), de prendre en compte les caractéristiques biologiques des différentes espèces et les différentes voies d'exposition (eau, sols, sédiment, nourriture) dans l'évaluation des risques écotoxicologiques liés aux nanoparticules d'argent ;

²³ L'épigénétique est définie comme « l'étude des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose, mais ne découlent pas de modifications dans la séquence de l'ADN » Deltour, S., Chopin, V. and Leprince, D., (2005) - Modifications épigénétiques et cancer, Médecine/Sciences 21, 405–411.

- d'étudier leur transformation dans les organismes (ex : influence des sucs digestifs) ;
- d'identifier les mécanismes responsables de leur toxicité, en utilisant par exemple des biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique (sub-organismal, organisme, population) ;
- de renforcer les études portant sur le transfert des nanoparticules d'argent dans les réseaux trophiques et de prendre en compte le transfert de toxicité dans la chaîne alimentaire ;

Concernant l'activité antibactérienne et la résistance bactérienne

Considérant :

- le nombre élevé de publications scientifiques et le rapport du Scenihp de décembre 2013 sur les nanoparticules d'argent ;
- l'hétérogénéité des résultats de la plupart des travaux publiés ;
- la dépendance de la réactivité des nanoparticules d'argent vis-à-vis de leur environnement (cellules, polymères, dispersants, ions, etc.) et de la présence d'impuretés dues aux procédés de fabrication ;
- les progrès sur la compréhension des modes d'action respectifs des nanoparticules d'argent et de l'ion argent sur l'activité antibactérienne en laboratoire ;
- la capacité d'adaptation des bactéries à l'ion argent monovalent et les résistances croisées à certains antibiotiques en laboratoire ;
- les difficultés à déterminer les mécanismes d'action de résistance de l'argent sous sa forme nanoparticulaire ;

le CES recommande :

- de renseigner systématiquement, et le plus précisément possible, les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent associées à l'état brut (impuretés de synthèse incluses) ou après leur dispersion en solution colloïdale (présence de co-formulants ou de tensio-actifs). Ces informations essentielles permettent l'interprétation et la comparaison des résultats d'études sur l'activité antimicrobienne en différenciant l'effet des nanoparticules d'argent de celui de l'ion argent ;
- de développer des outils et des protocoles standardisés pour évaluer des niveaux de résistance et garantir l'interprétation des résultats, et faciliter les comparaisons inter-études ;
- de mener des études sur la résistance bactérienne en milieu naturel tout comme des études épidémiologiques pour évaluer la prévalence de gènes de résistance bactérienne à l'argent ;
- d'engager des recherches permettant d'évaluer le transfert de gène de résistance et leur propagation ;
- d'étudier la stabilité des paramètres physicochimiques (en particulier dissolution et spéciation) en fonction du milieu (présence d'ions, de protéines, de dispersants, etc.) et de leur évolution dans le temps et des étapes du cycle de vie de ces nanoparticules d'argent.

En matière d'encadrement réglementaire

Considérant :

- l'absence, à l'heure actuelle, d'un inventaire permettant d'assurer la traçabilité des nanoparticules d'argent tout au long de leur cycle de vie ;
- l'insuffisance et le caractère lacunaire des données d'exposition disponibles sur les nanoparticules d'argent et sur les produits en contenant ;
- l'hétérogénéité des définitions adoptées pour la prise en compte de la spécificité des nanomatériaux dans les réglementations existantes ;

- l'entrée en vigueur, depuis le 1er janvier 2013, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-8 du Code de l'environnement, de la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire fabriquées, importées ou distribuées sur le territoire français et l'absence de déclarations de substances à l'état nanoparticulaire à base d'argent pour l'année 2013 en France ;
- le caractère insuffisant, voire inexistant, des informations destinées aux consommateurs et à la population générale (étiquetage et/ou informations issues de la déclaration obligatoire) en application des réglementations existantes ;
- la difficulté persistante à différencier les effets qui sont dus à l'ion argent de ceux que l'on peut directement imputer aux nanoparticules d'argent (voire leurs effets combinés quand ils sont tous les deux présents) ;

le CES recommande :

- d'entreprendre des travaux visant à comprendre l'absence de déclaration de nanoparticules d'argent en France en 2013 ;
- de réviser, en cas de défaut de déclaration avéré, les modalités de l'obligation de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire afin de pouvoir identifier, évaluer la quantité et déterminer les usages des nanoparticules d'argent produites, importées et distribuées à tous les utilisateurs, *a minima* pour le territoire national, dans le cadre suivant :
 - o extension aux distributeurs de produits grand public (en complément des distributeurs à destination des utilisateurs professionnels) ;
 - o amélioration de l'information du public en limitant les possibilités de confidentialité ;
- de travailler à l'évolution de la déclaration obligatoire afin de demander aux déclarants de fournir des données complémentaires concernant les nanoparticules d'argent déclarées (concentration, informations disponibles sur la toxicité, etc.). Par ailleurs, les fiches de données de sécurité devraient être enrichies par des informations adaptées au statut nanométrique de l'argent, pour les différentes étapes du cycle de vie des produits. L'ensemble de ces informations pourrait être recensé dans une base de données à accès public ;
- d'engager des études visant à évaluer l'intérêt et l'impact de la mise en place d'obligations d'étiquetage dans des réglementations sectorielles (ex : cosmétiques), afin de mesurer la pertinence d'une extension de telles obligations dans le cadre de réglementations plus larges et la cohérence entre cet éventuel étiquetage et les données issues de la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire ;
- d'étudier la faisabilité de limiter le recours aux nanoparticules d'argent aux usages essentiels, en :
 - o favorisant les produits sûrs dépourvus de nanoparticules d'argent et équivalents en termes de fonction et d'efficacité ;
 - o restreignant le recours aux produits susceptibles de libérer des nanoparticules d'argent ou des espèces chimiques pouvant présenter un risque pour l'homme ou pour l'environnement au cours de leur utilisation, sous contraintes d'usage normal et en fin de vie. Le critère de persistance dans l'environnement devrait être également pris en compte, dans l'éventualité d'un impact à long terme ;
 - o restreignant le recours aux produits dont l'utilité démontrée serait faible pour les consommateurs, sur la base d'une analyse socio-économique.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail reprend les conclusions et recommandations formulées par le CES « Agents physiques, nouvelles

technologies et grands aménagements » ci-dessus. Par ailleurs, prenant en compte l'ensemble des travaux portés par l'Agence sur la thématique des nanomatériaux²⁴ et plus particulièrement son avis du 15 avril 2014 relatif à l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux, elle les complète ci-après.

Depuis 2010, de nombreux articles scientifiques ont été publiés sur l'évaluation de la toxicité des nanoparticules d'argent. Les résultats de ces travaux sont le plus souvent contradictoires, ce qui à ce jour rend encore difficile l'estimation de la toxicité de ces nanoparticules d'argent. Les études d'écotoxicité sont par ailleurs de plus en plus nombreuses. Elles montrent des effets biologiques dans tous les organismes aquatiques et terrestres étudiés. Par ailleurs, des travaux en laboratoire ont mis en évidence une différence d'activité antibactérienne de l'ion argent par rapport à celle des nanoparticules d'argent ainsi que des résistances croisées à certains antibiotiques²⁵, qui s'expliquent par la capacité d'adaptation des bactéries à l'ion argent monovalent. Cependant, en conditions naturelles, il est impossible aujourd'hui de distinguer la contribution respective des nanoparticules d'argent et de l'argent ionique à l'activité antibactérienne.

Les recommandations suivantes de l'Agence concernant les nanoparticules d'argent s'inscrivent dans l'approche générale décrite dans son avis publié relatif aux risques liés aux nanomatériaux manufacturés (avril 2014). L'Anses souligne ainsi la nécessité :

- d'encourager les travaux de recherche dans les domaines de la caractérisation physico-chimique, l'évaluation de l'exposition, de la toxicologie et de l'écotoxicologie, de l'évaluation de l'efficacité antibactérienne et de la résistance bactérienne,
 - par la mise en œuvre de projets de recherche pluridisciplinaires visant à développer la connaissance des mécanismes d'action toxiques attribués respectivement aux nanoparticules d'argent et à l'ion argent monovalent. Ces projets devront procéder à une caractérisation physico-chimique complète et systématique des nanoparticules d'argent avant et pendant les tests ;
 - par la poursuite d'études approfondies concernant les effets potentiels sur la santé humaine liés à une exposition chronique aux nanoparticules d'argent (bioaccumulation, effet neurotoxique, reprotoxique et tératogène, etc.). Au regard des éléments de toxicité rapportés par la littérature scientifique, la voie d'exposition *a priori* la plus pertinente est celle par ingestion ;
 - par de nouvelles études sur le devenir et le comportement (agglomération, transport physique et trophique, persistance, etc.) des nanoparticules d'argent susceptibles d'être présentes dans l'environnement (usure, combustion, mise en décharge, recyclage etc.). La prise en compte du transfert de toxicité le long de la chaîne alimentaire est à considérer ;
 - par la réalisation d'études « hors laboratoire », en situation réelle, concernant l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent et les résistances croisées aux antibiotiques et la capacité d'adaptation des bactéries ;
- de renforcer la traçabilité des données et l'information des consommateurs sur les produits contenant des nanoparticules d'argent. L'Agence souligne que cette traçabilité ne peut être atteinte par la seule voie de la déclaration obligatoire prévue à l'article L 523-1 du Code de l'environnement.

L'Agence rappelle par ailleurs que, dans le cadre de la Directive européenne 2002/46/CE du 10 juin 2002 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les compléments alimentaires, l'argent ne figure pas dans la liste des minéraux pouvant être utilisés

²⁴ État de l'art et évaluation des risques liés aux nanotubes de carbone (2011,2012), action conjointe européenne Nanogenotox (2013), avis sur la modification des annexes du règlement REACH (2014),...

²⁵ La résistance croisée est la résistance d'un microorganisme à un médicament, souvent un antibiotique, auquel il n'a pas été exposé, résultant d'une résistance acquise envers un autre médicament.

pour la fabrication des compléments alimentaires, qu'il soit sous forme nanoparticulaire ou non. Compte tenu de la présence de nano-argent dans des compléments alimentaires distribués notamment par le biais du commerce en ligne, l'Agence recommande de renforcer l'information des consommateurs et le contrôle de la distribution de ces compléments alimentaires qui contiendraient des nanoparticules d'argent.

Enfin, s'appuyant sur l'expertise réalisée par le groupe de travail « nanomatériaux et santé » sur l'évaluation des risques liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent, et sur les conclusions et recommandations émises par son Comité d'experts spécialisés « agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements », l'Anses recommande de limiter l'usage des nanoparticules d'argent (production, transformation, utilisation) aux applications dont l'utilité est clairement démontrée et pour lesquelles la balance des bénéfices pour la santé humaine au regard des risques pour l'environnement est positive.

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Nanomatériaux, nanoparticule, argent, évaluation des risques, exposition, danger, résistance, antibactérien, antimicrobien, réglementation, recherche.

Évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent

Mise à jour des connaissances

Saisine « n° 2011-SA-0224 - nanoparticules d'argent »

RAPPORT d'expertise collective

**Comité d'experts spécialisés « Agents physiques, nouvelles technologies et grands
aménagements »**

GT « Nanomatériaux et santé – alimentation, environnement, travail »

Mai 2014

Mots clés

Nanomatériaux, nanoparticule, argent, évaluation des risques, exposition, danger, résistance, antibactérien, anti-microbien, réglementation, recherche.

Présentation des intervenants

PREAMBULE : Les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Éric GAFFET – Directeur de l'Institut Jean Lamour, Directeur de recherche à l'UMR 7198 Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Université de Lorraine – Physico-chimie, Caractérisation.

Vice-président

M. Fabrice NESSLANY – Chef du service de toxicologie à l'Institut Pasteur de Lille (IPL) – Toxicologie, génotoxicité.

Membres

M. Jean-Yves BOTTERO – Directeur de recherche au Centre de Recherche et d'Enseignement de Géosciences de l'Environnement (CEREGE) – Écotoxicologue.

M. Patrick CHASKIEL – Enseignant-chercheur à l'Université Paul Sabatier-Toulouse III – Économie, Sciences de la communication.

M. Fernand DORIDOT – Enseignant-chercheur à l'Institut Catholique d'Arts et Métiers (ICAM) de Lille – Histoire et philosophie des sciences, gouvernance des technologies.

Mme Valérie FESSARD – Chef d'unité Toxicologie des Contaminants à l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) – Toxicologie *in vivo*.

M. Emmanuel FLAHAUT – Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS) – Physico-chimie, Écotoxicologue.

Mme Stéphanie LACOUR – Chargée de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS) – Réglementation = et régulation des nouvelles technologies.

M. Stéphane MALARD – Conseiller médical en toxicologie professionnelle à l'Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS) – Médecine du travail.

M. Charles MOTZKUS – Chef de projet au Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE) – Métrologie, Physico-chimie.

Mme Catherine MOUNEYRAC – Professeur, Directrice de l'Institut de Biologie et d'Ecologie Appliquée de l'Université catholique de l'ouest (UCO) – Ecotoxicologie.

Mme Myriam RICAUD – Expert à l'Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS) – Prévention des risques chimiques, nanotechnologies.

M. Didier ROUXEL – Enseignant-chercheur à l'Université de Lorraine – Physico-chimie, Surfaces et interfaces.

M. Alan SANH – Évaluateur à l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) – Toxicologie.

Mme Anne VAN DER MEEREN – Chercheur (CEA Arpajon) – Toxicologie.

COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

Les travaux objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Agents Physiques, nouvelles technologies et grands aménagements ».

Mandat 2011-2013

Présidente

Martine HOURS – Médecin épidémiologiste, Directeur de recherche à l'Institut français des sciences et technologies des transports, de l'aménagement et des réseaux (Ifsttar).

Membres

Francine BEHAR-COHEN – Ophtalmologiste praticienne, Directeur de recherche à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm).

Jean-Marc BERTHO – Chercheur / Expert en radiobiologie au laboratoire de radiotoxicologie expérimentale de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN).

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

Frédéric COUTURIER – Ingénieur, Responsable du département « Études » à l'Agence Nationale des Fréquences (ANFR).

Jean-François DORÉ – Directeur de recherche émérite à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm).

Pierre DUCIMETIÈRE – Directeur de recherche honoraire à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm).

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

Nicolas FELTIN – Responsable de mission au Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE).

Emmanuel FLAHAUT – Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

Eric GAFFET – Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

Murielle LAFAYE – Ingénieur, Coordinatrice applications au Centre national d'études spatiales (CNES).

Philippe LEPOUTRE – Ingénieur acousticien, Responsable du pôle technique de l'Autorité de Contrôle des Nuisances Sonores Aéroportuaires (Acrusa).

Christophe MARTINSONS – Docteur en physique, Chef de pôle au Centre scientifique et technique du bâtiment (CSTB).

Catherine MOUNEYRAC – Directrice de l'Institut de biologie et d'écologie appliquée et Professeur en écotoxicologie aquatique à l'Université catholique de l'ouest (UCO).

Alain MUZET – Retraité CNRS, médecin, spécialiste du sommeil et de la vigilance.

Yves SICARD – Maître de conférences à l'Université Josef Fourier, Conseiller Scientifique au Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies alternatives (CEA).

Alain SOYEZ – Responsable de laboratoires, Ingénieur conseil, Caisse d'assurance retraite et de santé au travail Nord Picardie.

Esko TOPPILA – Professeur, Directeur de recherche à l'Institut finlandais de santé au travail.

Catherine YARDIN – Professeur, chef de service, médecin biologiste à l'Hôpital Dupuytren, CHU de Limoges.

Mandat 2014-2016**Présidente**

Martine HOURS – Médecin épidémiologiste, Directeur de recherche à l'Institut français des sciences et technologies des transports, de l'aménagement et des réseaux (Ifsttar).

Membres

Laurent BEUGNET – Médecin du travail, RATP.

Alexandre BOUNOUH – Chef de projet / Ingénieur de recherche au Laboratoire national d'essais (LNE).

Pierre CAMPO – Chercheur, Institut de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS).

Brigitte DEBUIRE – Professeur des universités émérite.

Jean-François DORÉ – Directeur de recherche émérite à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm).

Thierry DOUKI – Chef de laboratoire / Ingénieur docteur en chimie, Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA).

Pierre DUCIMETIÈRE – Directeur de recherche honoraire à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm).

Nicolas FELTIN – Responsable de mission au Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE).

Emmanuel FLAHAUT – Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

Eric GAFFET – Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

Claude GRONFIER – Chercheur, Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm).

Murielle LAFAYE – Ingénieur, Coordinatrice applications au Centre national d'études spatiales (Cnes).

Joël LELONG – Directeur adjoint de laboratoire / Docteur en physique, Institut français des sciences et technologies des transports, de l'aménagement et des réseaux (Ifsttar).

Christophe MARTINSONS – Docteur en physique, Chef de pôle au Centre scientifique et technique du bâtiment (CSTB).

Frédérique MOATI – Maître de conférences en biophysique et médecine nucléaire, Université Paris Sud XI / Praticien hospitalier / Radiopharmacienne / Biologiste, AP-HP Hôpital Bicêtre.

Catherine MOUNEYRAC – Directrice de l'Institut de biologie et d'écologie appliquée et Professeur en écotoxicologie aquatique à l'Université catholique de l'ouest (UCO).

Fabien NDAGIJIMANA – Professeur des universités, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Alain SOYEZ – Responsable de laboratoires, Ingénieur conseil, Caisse d'assurance retraite et de santé au travail Nord Picardie.

Esko TOPPILA – Professeur, Directeur de recherche à l'Institut finlandais de santé au travail.

Catherine YARDIN – Professeur, chef de service, médecin biologiste à l'Hôpital Dupuytren, CHU de Limoges.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Nathalie THIERIET – Chef de projet scientifique – Unité évaluation des risques liés aux agents physiques – Anses.

Contribution scientifique

Isabelle ATTIG – Chef d'unité évaluation efficacité biocides – Anses.

Anthony CADÈNE – Chef de projet scientifique – Unité évaluation des risques liés aux agents physiques – Anses.

Jenny DUPIN – Stagiaire master 2 – Unité évaluation des risques liés aux agents physiques – Anses.

Olivier MERCKEL – Chef d'unité évaluation des risques liés aux agents physiques – Anses.

Adeline TARANTINI – Chargée de projet scientifique – Unité évaluation des risques liés aux agents physiques – Anses.

Secrétariat administratif

Sophia SADDOKI – Anses.

EXPERT RAPPORTEUR

Pierre MARIS – Directeur adjoint du laboratoire de Fougères de l'Anses – Microbiologie, biocides.

SOMMAIRE

Présentation des intervenants.....	3
Présentation des intervenants.....	3
SOMMAIRE	7
Expertise collective : synthèse de l'argumentaire et conclusions	10
Sigles et abréviations	22
Liste des tableaux.....	23
Liste des figures	24
 1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	25
1.1 Généralités.....	25
1.2 Contexte de la demande.....	26
1.3 Objet de la saisine.....	27
1.4 Modalités de traitement :.....	27
 2 Méthodologie d'expertise	28
 3 Comparaison bibliographique des rapports du BfR et de l'Anses.....	29
 4 Présence des nanoparticules d'argent dans les produits de consommation	31
4.1 Les nanoparticules d'argent dans le monde	32
4.2 Les nanoparticules d'argent en France	32
4.3 Exposition aux nanoparticules d'argent et risques associés.....	33
4.4 Niveaux d'exposition aux nanoparticules d'argent	35
 5 Évolution réglementaire :	36
 6 Mise à jour des connaissances relatives à l'activité antibactérienne	39
6.1 Considérations préalables sur les caractérisations physico-chimiques des nanoparticules.....	39
6.2 Impact de l'environnement sur l'activité antibactérienne	40
6.3 Différence de comportement des nanoparticules d'argent <i>versus</i> l'ion Argent.....	41
6.4 Résistance bactérienne à l'argent :	42
6.5 Synthèse et recommandations relatives à l'activité antimicrobienne	44
 7 Mise à jour des connaissances relatives aux dangers spécifiques des nanoparticules d'argent.....	46
7.1 Caractérisation et paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent.....	46
7.1.1 Paramètres physico-chimiques généralement retenus	46
7.1.2 Principales techniques de caractérisation utilisées	46
7.1.3 Influence des paramètres physico-chimiques sur les effets (éco)toxicologiques.....	52

7.1.4 Synthèse et recommandations	53
7.2 Effets sur la santé	55
7.2.1 Comportement / Distribution	55
7.2.1.1 In vitro	55
7.2.1.2 Passage de barrières	57
7.2.1.3 In vivo - biodistribution	57
7.2.2 Toxicologie générale	59
7.2.2.1 Toxicité in vitro	59
7.2.2.2 Toxicité <i>in vivo</i>	60
7.2.2.3 Discussion sur la toxicité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	65
7.2.3 Génotoxicité	67
7.2.3.1 Génotoxicité <i>in vitro</i>	67
7.2.3.2 Génotoxicité <i>in vivo</i>	71
7.2.3.3 Discussion sur la génotoxicité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	73
7.2.4 Toxicités spécifiques	75
7.2.4.1 Inflammation	75
7.2.4.2 Immunotoxicité	76
7.2.4.3 Coagulation	77
7.2.4.4 Tératogenèse / toxicité pour la reproduction	77
7.2.4.5 Neurotoxicité	79
7.2.5 Toxicité humaine	80
7.2.6 Synthèse et recommandations	80
7.3 Études écotoxicologiques	83
7.3.1 Bioaccumulation des nanoparticules dans les organismes	84
7.3.2 Poissons	86
7.3.3 Mollusques et crustacés	87
7.3.4 Algues	87
7.3.5 Vers	88
7.3.6 Microorganismes	88
7.3.7 Mécanismes d'action écotoxique	89
7.3.8 Synthèse et recommandations	90
8 Conclusions et recommandations du groupe de travail	91
8.1 Conclusions	91
8.2 Recommandations du groupe de travail	94
9 Bibliographie	101
ANNEXES	123
Annexe 1 : Lettre de saisine	124
Annexe 2 : Toxicologie — Tableaux de synthèse d'analyse bibliographique	126
Annexe 3 : Toxicité et génotoxicité des nanoparticules d'argent	154
1 Toxicité in vitro	154
1.1 Cellules immunitaires	154
1.2 Cellules souches	154
1.3 Cellules pulmonaires	155
1.4 Cellules hépatiques	155
1.5 Cellules rénales	156
1.6 Cellules intestinales	156
1.7 Cellules cutanées	156

2	Génotoxicité <i>in vitro</i>	157
2.1	Altérations primaires de l'ADN	157
2.2	Mutations géniques	159
2.3	Mutations chromosomiques	160
3	Génotoxicité <i>in vivo</i>	161
4	Modes d'action génotoxiques	163
4.1	Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)	164
4.2	Implication des ions Ag ⁺ dans l'activité génotoxique des nanoparticules d'argent	164

Expertise collective : synthèse de l'argumentaire et conclusions

relatives à l'expertise concernant la mise à jour des connaissances sur « l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent »

Ce document synthétise les travaux du comité d'experts spécialisé et du groupe de travail
« Nanomatériaux et santé – alimentation, environnement, travail ».

Présentation de la question posée

L'Institut fédéral allemand d'évaluation des risques (*Bundesinstitut für Risikobewertung* - BfR) et l'Anses avaient conclu dans leurs avis respectifs du 28 décembre 2009 et du 17 mars 2010 que les données disponibles étaient insuffisantes pour permettre l'évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition au nano-argent. Cependant, alors que le BfR recommandait aux industriels de renoncer à l'utilisation d'argent ou de composés d'argent à l'échelle nanométrique dans les produits alimentaires et les produits de consommation courante, l'Anses préconisait de limiter l'exposition des consommateurs aux produits contenant des nanomatériaux et leur dissémination dans l'environnement, selon une approche graduelle.

L'Anses a été saisie le 10 août 2011 par la Direction générale de la santé (DGS), la Direction générale du travail (DGT) ainsi que la Direction générale de l'alimentation (DGAL), la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) afin de :

- 1) analyser les éventuelles différences existant entre les connaissances scientifiques sur lesquelles se sont fondés les travaux du BfR d'une part et ceux de l'Anses d'autre part ;
- 2) mettre à jour l'évaluation des risques liés au nano-argent pour la population générale, pour les travailleurs, pour l'alimentation et pour l'environnement, compte tenu notamment de l'existence de nouvelles publications scientifiques parues depuis la rédaction des rapports de l'Anses et du BfR.

Contextes scientifique et réglementaire

Les nanoparticules d'argent sous forme agrégée, agglomérée ou encore colloïdale, sont utilisées pour un grand nombre d'applications parmi lesquelles on peut citer :

- pour l'alimentation : les additifs et emballages alimentaires et les revêtements de réfrigérateurs ;
- dans le domaine des textiles : les vêtements et la literie ;
- ou encore pour les produits cosmétiques et d'hygiène : les brosses à dents, les fers à lisser les cheveux, les *sprays* désinfectants, etc.

L'intégration de ces nanoparticules dans des articles commerciaux est réputée répondre principalement à des finalités antibactériennes et antifongiques. Bien qu'il n'existe actuellement aucun inventaire officiel des produits contenant des nanoparticules d'argent dans le Monde ou en France, des sources non officielles comme le *Woodrow Wilson Institute* révèlent que les produits contenant ces nanoparticules seraient à la fois les nanoproducts les plus abondants sur le marché depuis 2011 mais aussi que leur nombre est en croissance.

L'entrée en vigueur, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-8 du Code de l'environnement (loi Grenelle II du 12 juillet 2010), de la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire a permis de dresser un premier état des connaissances de l'identité, des usages et des quantités de nanomatériaux produits, importés et distribués en France¹. Il souligne la présence de tonnages importants de nanomatériaux présents sur le marché français. Cependant, cet état des lieux permet de constater l'absence de déclaration concernant la production, l'importation ou la distribution de nanoparticules d'argent alors même que des produits de consommation contenant de telles nanoparticules sont identifiés sur le marché français (cf. avis et rapport Anses 2010)².

Les expertises menées par l'Anses et par le BfR en 2010 avaient conclu à l'impossibilité de réaliser une évaluation des risques liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent, en raison notamment du manque de données. Depuis, de nouvelles études scientifiques ont été produites, qui justifient la mise à jour des connaissances et de l'évaluation des risques liés aux nanoparticules d'argent pour la population générale, les travailleurs et l'environnement.

Organisation de l'expertise

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » l'instruction de cette saisine. Ce dernier a, dans un premier temps, mandaté quatre experts rapporteurs pour réaliser l'analyse comparée des différences bibliographiques entre le rapport du BfR et celui de l'Anses (phase 1 de l'expertise).

L'Agence a, par la suite, mandaté le groupe de travail « Nanomatériaux et santé – alimentation, environnement, travail » pour réaliser une mise à jour de l'évaluation des risques liés au nano-argent (phase 2). Pour ce qui concerne l'activité antibactérienne et la bactériorésistance, le groupe de travail s'est appuyé sur l'expertise de deux scientifiques de l'Anses, spécialistes du domaine.

Ces travaux d'expertise ont été soumis régulièrement au CES, tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Le rapport final produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux d'expertise sont ainsi 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 ».

Description de la méthode

La mise à jour des connaissances s'est appuyée sur une revue bibliographique de la littérature relative aux nanoparticules d'argent publiée entre décembre 2009 et décembre 2013 ou portant sur de nouvelles voies d'exposition, en tenant compte des résultats précédents décrits dans le rapport publié par l'Agence en 2010.

Les travaux scientifiques retenus dans ce nouveau rapport sont issus :

- de publications dans des revues scientifiques internationales avec comité de lecture ;
- de rapports d'études scientifiques, d'organismes et d'organisations non gouvernementales (avis du Scenihl³, rapport du Beuc et de l'Anec⁴, etc.).

¹ http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_public_format_final_20131125.pdf.

² Anses (2010) Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement. Anses.

³ *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*, Scenihl (2010) *Scientific Basis for the Definition of the Term "nanomaterial"*. European Commission, Brussels, Belgium.

Compte tenu de l'abondance des publications sur le sujet, une sélection des articles fournissant des résultats originaux a été effectuée par les experts du groupe de travail. Les articles pour lesquels la caractérisation de l'argent sous toutes ses formes a été jugée insuffisante ont été exclus. C'est ainsi que 280 articles scientifiques portant sur la toxicité et l'écotoxicité des nanoparticules d'argent ont été identifiés et analysés.

Le domaine « activité bactérienne et bactériorésistance » a été inclus dans cette expertise et couvert par une recherche bibliographique spécifique.

Un chapitre a été consacré à l'identification des sources d'exposition des consommateurs et de l'environnement, à partir de la base de données des nano-produits réalisée par l'Anses dans le cadre du rapport « Nanomatériaux et produits de consommation » (2010) et de l'inventaire du *Woodrow Wilson Institute*. La liste non exhaustive réalisée par l'Observatoire régional des déchets industriels en Midi-Pyrénées en 2009 (Ordimp)⁵ a permis également de compléter le recensement des produits de consommation contenant des nanoparticules d'argent présents sur le territoire français.

Résultat de l'expertise collective

Le comité d'experts spécialisé « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » a adopté les travaux d'expertise collective du groupe de travail « Nanomatériaux et santé – alimentation, environnement, travail » ainsi que ses conclusions et recommandations, lors de sa séance du 20 juin 2014 et a fait part de cette adoption à la direction générale de l'Anses.

Conclusions et recommandations de l'expertise collective

➤ Préambule

Le CES reprend ci-dessous les conclusions générales et les recommandations formulées par le groupe de travail dans son rapport d'expertise, en les complétant le cas échéant.

L'usage du terme « nano-argent », c'est-à-dire l'argent à l'état nanoparticulaire, s'inscrit dans le sillage de la plupart des réglementations encore en vigueur aujourd'hui, pour lesquelles seule compte la composition chimique de la substance générique. On retrouve en réalité sous le vocable « nano-argent » des nanoparticules potentiellement très différentes, qui se distinguent notamment par leur distribution en taille, leur morphologie, leur traitement⁶ ou fonctionnalisation de surface.

Des travaux antérieurs, en particulier ceux menés au sein du groupe de travail sur les nanomatériaux manufacturés de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE)⁷ ou encore du comité technique « Nanotechnologies » de l'Organisation internationale de normalisation (ISO⁸-TC229), démontrent que la réactivité chimique et biologique des nanoparticules est fonction d'un ensemble de paramètres physico-chimiques les caractérisant (et pas uniquement de leur composition chimique) et des interactions avec leur environnement.

Ces considérations ont conduit le groupe de travail à rappeler qu'il est impossible d'aboutir à une conclusion unique et généralisable à l'ensemble des nanoparticules d'argent pour ce qui concerne leur identification, l'évaluation de leur dangerosité, leur activité antibactérienne et les possibles

⁴ Bureau européen des unions de consommateurs et Association Européenne pour la coordination de la représentation des consommateurs auprès de la standardisation, ANEC and BEUC, (2012) Nano : *Very Small and Everywhere* - http://www.anec.eu/attachments/ANEC_BEUC%20nanosilver%20brochure%20updated.pdf.

⁵ Les nanoparticules dans les déchets : un chantier à ouvrir. « Le savoir : un préalable à la gestion » (ORDIMIP, octobre 2009).

⁶ Par exemple par une étape de sablage ou de purification.

⁷ WPMN : *Working party on manufactured nanomaterials* – OCDE.

⁸ ISO : *International Standardization Organization*.

phénomènes de bactériorésistance, quelles que soient leurs applications envisagées ou existantes. En effet, l'hétérogénéité des résultats publiés sur tous ces points s'explique en premier lieu par les différences portant sur les caractéristiques physico-chimiques des diverses nanoparticules d'argent étudiées mais aussi par les défauts méthodologiques des tests utilisés.

Enfin, le groupe de travail souligne que l'utilisation de l'argent sous toutes ses formes (ionique, nanoparticulaire, massique, etc.) est revendiquée principalement pour son activité antimicrobienne. Par activité antimicrobienne, il faut comprendre soit un effet inhibiteur de croissance des micro-organismes, soit un effet létal vis-à-vis de ces micro-organismes, les bactéries étant le plus souvent citées. En conséquence, l'emploi de l'argent pour ce type d'applications antibactériennes peut entraîner l'apparition de phénomènes de bactériorésistance et avoir un impact négatif sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème. Cette activité antibactérienne et ses possibles conséquences doivent donc être nécessairement prises en compte dans le cadre de l'évaluation des risques liés aux nanoparticules d'argent.

Bien que le nombre d'études scientifiques portant sur l'évaluation des effets biologiques et des expositions liés aux nanoparticules d'argent ait fortement augmenté, le CES rappelle qu'en l'état actuel des connaissances il n'est toujours pas possible d'évaluer les risques liés aux nanoparticules d'argent et leurs usages.

➤ Exposition

L'évaluation des connaissances disponibles sur les effets induits par les nanoparticules d'argent sur la santé et l'environnement doit nécessairement être associée à une évaluation des sources et des conditions d'exposition de l'homme et de son environnement. Il convient notamment de déterminer précisément quelles sont les sources d'exposition potentielles des populations (travailleurs, consommateurs, riverains de sites industriels, etc.) et de l'environnement, afin de considérer non seulement les voies d'exposition humaine aux nanoparticules d'argent les plus probables (voie cutanée, respiratoire ou orale), mais aussi d'estimer les doses (nombre, masse, surface, pourcentage ionique) auxquelles les populations concernées et l'environnement pourraient être concrètement exposés, tout au long du cycle de vie des différents produits contenant des nanoparticules d'argent.

Depuis le 1^{er} janvier 2013, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-8 du Code de l'environnement, est entrée en vigueur la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire fabriquées, importées ou distribuées sur le territoire français. Sur le plan de l'exposition professionnelle, l'analyse du bilan de la première année de mise en œuvre de la déclaration obligatoire indique que les nanoparticules d'argent ne seraient ni fabriquées, ni importées, ni distribuées à des utilisateurs professionnels sur le territoire français, excepté pour des activités de recherche et développement, portant alors sur une quantité totale inférieure à 1 kg.

D'autres inventaires⁹ mentionnent pourtant leur présence dans des produits de consommation. Cet usage est également rapporté par la consultation des sites internet d'entreprises qui distribuent leurs produits sur le territoire national¹⁰. En l'absence de sources de données fiables permettant d'évaluer l'exposition, les experts sont contraints, comme cela a été fait dans le rapport de l'Anses publié en 2010, d'estimer cette dernière sur la base de *scenarii* plus ou moins réalistes ou d'extrapoler à partir de cas théoriques. S'ils permettent de mieux comprendre les risques éventuels liés aux nanoparticules d'argent, de tels *scenarii* ne permettent toutefois pas de mener des évaluations quantitatives des risques réalistes.

Le CES souligne que la base de données issue de la déclaration obligatoire des nanomatériaux (<https://www.r-nano.fr/>) constitue une première étape importante pour connaître l'exposition, en particulier professionnelle, aux nanomatériaux. Aussi, le CES recommande d'améliorer les

⁹ Voir le chapitre 4 du présent rapport.

¹⁰ Voir le paragraphe 4.2 du présent rapport.

modalités de déclaration afin de mieux identifier la présence de nanoparticules d'argent importées, produites et distribuées sur le territoire national.

➤ Caractérisation physico-chimique

L'analyse des articles scientifiques publiés postérieurement à ceux pris en compte lors du précédent rapport de l'Anses (2010) permet de constater que la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent utilisées est réalisée aujourd'hui de façon plus systématique et de manière plus pertinente. L'intégration de plusieurs méthodes de mesures accompagnées d'informations assurant la traçabilité des mesures, notamment, aboutit à l'obtention de données plus robustes. Certains articles rapportent également des mesures réalisées afin d'étudier la stabilité temporelle des suspensions, la vitesse de dissolution et la teneur en ions argent (Ag^+) au cours du temps dans des substrats représentatifs des milieux de culture cellulaires des tests *in vitro*. Cependant, encore trop peu d'études s'intéressent aux variations des paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent dans les tests *in vitro* et *in vivo*.

Des progrès en matière de caractérisation physico-chimique sont donc notés dans la littérature scientifique, mais il subsiste encore des lacunes, notamment concernant les données de dissolution des nanoparticules (et donc sur la teneur en Ag^+ ou encore sur la spéciation de l'argent)¹¹.

Malgré ces progrès, la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent dans les sources d'exposition et dans les matrices complexes demeure difficile, en raison :

- du nombre limité de méthodes permettant cette caractérisation, de leur complexité de mise en œuvre, de leur difficulté d'accès (synchrotron) et de leur coût ;
- du manque de méthodes de mesures standardisées ainsi que de matériaux de référence à l'échelle nanométrique, certifiés ou non (MRC ou MR) ;
- des lacunes dans la connaissance de la stabilité des paramètres physico-chimiques (en particulier dissolution, spéciation et état d'agglomération) en fonction du milieu (présence d'ions, de protéines, de dispersants, etc.) et de leur évolution dans le temps ;
- ainsi que des lacunes dans la connaissance du cycle de vie de ces nanoparticules d'argent.

➤ Toxicologie - effets sur la santé

Depuis 2010, de nombreux articles ont été publiés sur l'évaluation de la toxicité et de la génotoxicité *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules d'argent, rapportant des résultats pour la plupart contradictoires, ce qui rend l'estimation de la dangerosité de ces nanoparticules encore difficile à ce jour.

Les études de biodistribution menées chez le rongeur et le lapin ont permis de mettre en évidence une accumulation préférentielle dans le foie, la rate, les reins et les poumons, quelle que soit la voie d'administration - avec des niveaux plus élevés chez les femelles que chez les mâles pour les reins.

Certaines publications relatives à des expérimentations *in vivo* (exposition aux nanoparticules d'argent) soulignent le passage d'argent de forme indéterminée (ionique ou nanoparticulaire) à travers les barrières hémato-encéphalique, placentaire ou encore hémato-testiculaire. Toutefois, les mécanismes ne sont pas élucidés, notamment par manque d'expérimentations *in vitro* ou *ex vivo*.

¹¹ La solubilisation s'entend ici comme celle utilisée couramment en chimie, qui correspond à la formation de paires d'ions en solution aqueuse. Par dispersion, on entend la formation d'une solution colloïdale de nanoparticules, invisible à l'œil nu. Cette définition est différente de celle proposée par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC).

Des expositions aiguës¹² ou sub-chroniques¹³ chez les petits rongeurs et le lapin ont entraîné peu d'effets cliniques ou comportementaux, quelle que soit la voie d'exposition utilisée. Néanmoins, des effets¹⁴ sont rapportés au niveau des organes primo-exposés (poumons, intestin) ou des organes systémiques (foie, rate et reins essentiellement).

Il est difficile d'estimer le potentiel reprotoxique et tératogène des nanoparticules d'argent, compte-tenu du peu d'études disponibles sur animaux, bien que des effets à différents niveaux de la fonction de reproduction (production de gamètes, puberté, etc.) aient été observés. Chez le rongeur, il semble que les nanoparticules d'argent ne provoquent pas d'altérations morphologiques des embryons, mais un effet sur leur implantation et sur leur viabilité ne peut être exclu. Par ailleurs, l'accumulation d'argent observée dans différents organes des fœtus mériterait une attention particulière.

De même, les résultats de neurotoxicité chez le rongeur sont clairs et montrent *in vivo* des effets moteurs et des effets sur la mémoire qui restent cependant contradictoires. Aussi, compte tenu du passage potentiel des nanoparticules d'argent au travers des barrières hémato-encéphalique et sang/liquide cérébrospinal (sang-LCS) et de leur bioaccumulation, des effets toxiques au niveau du système nerveux central ne peuvent être exclus.

De manière générale, les mécanismes impliqués dans la toxicité et la génotoxicité des nanoparticules d'argent concernent le déséquilibre de la balance oxydo-réduction (stress oxydant) et l'inflammation.

Il n'est en général pas possible d'établir une courbe dose-réponse pour les effets rapportés, ce qui rend délicate l'interprétation des données toxicologiques.

En l'état des connaissances, les incohérences constatées peuvent s'expliquer par :

- des différences dans les expérimentations réalisées, concernant par exemple le type de nanoparticule d'argent (taille, revêtement), le type cellulaire utilisé, l'absorption cellulaire, la dissolution intracellulaire, le paramètre de toxicité étudié, la façon dont les cellules ou les animaux ont été exposés, etc. ;
- l'utilisation de protocoles très variables en matière de voies d'administration (intrapéritonéale, intraveineuse...), de doses administrées et d'espèces testées (drosophile, rats ...).

Enfin, bien que la présence d'argent ait été observée dans différents organes en fonction des voies d'administration, la forme sous laquelle cet argent est présent n'est pas établie. Il n'est pas non plus clairement établi si les effets observés lors de certains tests *in vitro* et *in vivo* sont exclusivement dus aux ions Ag^+ ou à la forme nanoparticulaire, voire éventuellement aux effets combinés entre les ions Ag^+ et les nanoparticules d'argent.

Écotoxicologie

Depuis 2009, le nombre de travaux en écotoxicologie et leur qualité ont progressé. En particulier, la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent est réalisée de façon plus systématique et plus approfondie, et les études en milieux complexes commencent à se développer par le biais d'études conduites en mésocosme, en plein air ou en laboratoire (eau douce).

Ces études récentes montrent que les nanoparticules d'argent sont bioaccumulées et qu'elles induisent des effets biologiques dans tous les organismes aquatiques et terrestres étudiés. Cependant, de nombreuses interrogations demeurent à propos de la localisation de ces nanoparticules dans les organismes (tissus, cellules) et du mécanisme d'action toxique, en

¹² Aiguë : une seule dose de 0,1 à 5 000 mg/kg.

¹³ Sub-chronique : 4 à 13 semaines, $\leq$ 500 mg/kg.

¹⁴ Pour les données sub-chroniques : diminution de la masse corporelle et de la masse de certains organes, des variations de paramètres biochimiques au niveau sanguin, des alopecies etc.

particulier en ce qui concerne la contribution de la forme ionique ou de la forme nanoparticulaire dans la toxicité. Ces incertitudes sont en partie dues à l'insuffisance des données disponibles sur le devenir et le comportement des nanoparticules d'argent dans l'environnement (influence des facteurs biotiques et abiotiques) au cours du temps. De plus, il existe toujours, à l'heure actuelle, une méconnaissance sur le transfert trophique des nanoparticules d'argent.

➤ **Activité antibactérienne et résistance**

L'étude de l'activité antibactérienne et de la résistance bactérienne n'avait pas fait l'objet d'une analyse spécifique dans la précédente expertise de l'Anses en 2010. Elle a été abordée par le groupe de travail à travers des données publiées pour la plupart postérieurement à 2009, et en utilisant l'analyse de la littérature scientifique publiée par le BfR¹⁵ en 2009.

Comme en toxicologie et en écotoxicologie, il faut souligner que le défaut de mesures ou d'informations précises sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent étudiées induit des biais quant à l'interprétation et à la comparaison des résultats des études portant sur l'activité antimicrobienne.

Concernant le mode d'action antibactérien des nanoparticules d'argent, des travaux en laboratoire ont permis de mettre en évidence une différence d'activité antibactérienne de l'ion argent par rapport à celle des nanoparticules d'argent. Cependant, il convient de souligner l'absence de travaux de recherche ciblés visant à étudier les mécanismes permettant d'expliquer cette différence.

Du fait de l'influence de la complexité et de la diversité des milieux naturels sur la stabilité des différentes espèces de l'argent, il est à ce stade impossible de distinguer la contribution respective des nanoparticules d'argent et de l'ion argent dans cette activité antibactérienne.

La capacité d'adaptation des bactéries à l'ion argent monovalent et les résistances croisées à certains antibiotiques ont été démontrées en laboratoire depuis de nombreuses années. Cependant, il n'est toujours pas possible de tirer de conclusions quant aux risques de propagation de cette résistance en conditions réelles. En effet, les études menées en milieux naturels sont encore trop peu nombreuses et aboutissent à des conclusions souvent contradictoires. Les travaux épidémiologiques permettant d'évaluer la prévalence des gènes de résistance à l'argent parmi les populations bactériennes font cependant défaut.

Recommandations du CES

Le CES souligne l'insuffisance des connaissances permettant d'évaluer les risques liés aux nanoparticules d'argent et à leurs utilisations. Ce constat illustre les nombreuses difficultés à réaliser une évaluation de risque des nanomatériaux, exposées dans le rapport de l'Anses récemment publié¹⁶. Aussi, face à une croissance soutenue de la mise sur le marché de produits intégrant des nanomatériaux, le CES reprend les recommandations exprimées par l'Agence dans son avis du 15 avril 2014 visant à un encadrement réglementaire renforcé pour les nanomatériaux et à la poursuite d'efforts de recherche portant sur la caractérisation physico-chimique, la connaissance des expositions et la dangerosité. Ces efforts permettraient de pouvoir établir une catégorisation des nanomatériaux en s'appuyant sur des approches alternatives (*safer by design*, QNAR, arbres décisionnels en fonction des étapes du cycle de vie, etc.) pour réduire le nombre d'études à réaliser au cas par cas lors de l'évaluation des risques.

Le succès aux appels à projets relatifs au développement des nanomatériaux pourrait être subordonné à l'intégration systématique d'études de toxicologie et d'écotoxicologie. Le CES encourage une coordination efficace et renforcée en ce qui concerne l'initiation, la sélection et la gestion des appels à projet, sans oublier un effort en matière de formation à la recherche. Un plan national de recherche tel que celui initié pour les perturbateurs endocriniens serait nécessaire.

¹⁵BfR : Institut fédéral allemand d'évaluation des risques (*Bundesinstitut für Risikobewertung*).

¹⁶ Anses - Évaluation des risques liés aux nanomatériaux : Enjeux et mise à jour des connaissances. Rapport d'expertise collective – 2014.

Concernant spécifiquement les nanoparticules d'argent, le CES émet les recommandations listées ci-dessous.

Dans le domaine de la caractérisation physico-chimique

Considérant en particulier :

- le fait que la réactivité des nanoparticules d'argent dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques ;
- le fait que les paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent ne sont pas nécessairement tous des paramètres intrinsèques des nanoparticules, mais sont dépendants du milieu d'exposition ainsi que du cycle de vie des nanoparticules d'argent ;

le CES recommande :

- de recourir systématiquement à une combinaison de plusieurs méthodes de caractérisation physico-chimique afin d'obtenir une connaissance aussi complète et fiable que possible des propriétés physico-chimiques des nanoparticules d'argent auxquelles sont exposés la population générale ou salariée ainsi que l'environnement ;
- de développer et d'utiliser des nanomatériaux de référence pour étalonner périodiquement les appareils de mesure et de s'assurer de la traçabilité métrologique des mesures. Cette étape est indispensable pour fiabiliser les mesures et les rendre comparables entre différentes techniques, différents laboratoires ou différents utilisateurs ;
- de favoriser le développement de méthodes de mesures des paramètres physico-chimiques en milieux complexes ;
- de caractériser les nanoparticules d'argent dans les modèles utilisés pour les tests (éco)toxicologiques, afin de comprendre le devenir et le comportement des nanoparticules d'argent diffusées dans l'environnement ;
- d'apporter une attention particulière à la stabilité ou à l'évolution de ces paramètres physico-chimiques dans les milieux réels d'exposition (en présence ou en l'absence des cellules lors des tests *in vitro*, ou en présence d'organismes lors des études écotoxicologiques notamment) ;
- d'établir des protocoles de référence d'échantillonnage afin de pouvoir comparer les études entre elles ;
- d'utiliser, de manière systématique, des méthodes de caractérisation de la dissolution des nanoparticules d'argent (et de la spéciation éventuelle) dans les études afin de progresser dans la compréhension des mécanismes d'action des nanoparticules d'argent vs les ions Ag^+ .

Dans le domaine de l'exposition

Considérant

- les lacunes et les difficultés persistantes concernant l'évaluation des expositions de la population générale et des travailleurs, notamment :
 - o la connaissance des sources d'exposition aux nanoparticules d'argent ;
 - o la traçabilité des mesures et de leurs incertitudes ;
 - o les conditions de prélèvement et d'échantillonnage des produits testés ;
 - o les connaissances relatives à la traçabilité de ces produits dans les milieux concernés ;

le CES recommande :

- d'améliorer ou de développer des méthodes :

- o de caractérisation des nanoparticules d'argent et de leurs suspensions *in situ* (fluides biologiques, matrices complexes, etc.) ;
 - o de mesure permettant de déterminer les doses réelles auxquelles sont exposés les consommateurs et les professionnels ;
- de développer et d'utiliser des matériaux de référence pour étalonner les appareils de mesure de l'exposition aux nanomatériaux ;
- de poursuivre et renforcer la documentation des émissions de nanoparticules d'argent et des expositions réelles des travailleurs, des consommateurs et des riverains.

Dans le domaine de la toxicologie

Considérant :

- l'hétérogénéité des résultats scientifiques publiés ;
- le fait que la réactivité des nanoparticules d'argent dépende notamment de leur environnement (cellule, polymère, dispersants, ions, etc.) ;
- la possibilité d'un franchissement des barrières physiologiques ;
- la possibilité de bioaccumulation dans des organes cibles ;
- le manque de données d'excrétion dans les études de toxicocinétique ;
- la possibilité de formation d'espèces réactives de l'oxygène pouvant provoquer des effets toxiques (cytotoxicité, génotoxicité, inflammation, apoptose, nécrose) ;
- l'impossibilité de statuer, en l'état actuel des connaissances, sur les effets reprotoxiques, neurotoxiques et génotoxiques des nanoparticules d'argent ;
- l'absence d'étude de cancérogénèse ;
- les faiblesses méthodologiques de l'unique étude toxicologique réalisée chez l'homme¹⁷ ;

le CES recommande :

- de procéder à une caractérisation physico-chimique complète et systématique (avant et au cours des tests toxicologiques) et de développer des travaux portant sur l'étude des modifications de la suspension des nanoparticules d'argent une fois introduites dans un milieu complexe ou un organisme ;
- de réaliser des études de toxicocinétique complètes (incluant les mesures d'excrétion), qui devraient être préalables à toute étude *in vitro* ou *in vivo*¹⁸ ;
- de renseigner systématiquement le *design* des expérimentations et de détailler leur mise en œuvre :
 - o en sélectionnant le modèle cellulaire ou l'espèce animale et le(s) paramètre(s) étudiés, afin d'être prédictif ;
 - o en s'assurant de la pertinence des doses et des durées de traitement utilisées afin d'éviter d'engendrer des résultats non spécifiques, peu ou non prédictifs d'une activité *in vivo*, les rendant finalement inutilisables pour caractériser les dangers ;
 - o en utilisant de préférence une voie d'exposition représentative d'une exposition humaine possible *in vivo* ;
 - o en évaluant différents événements génétiques pouvant mener à des phénomènes génotoxiques et/ou mutagènes tout en s'affranchissant d'éventuelles interférences dans les tests (colorants, réactifs, etc.) ;
 - o en discriminant les effets générés par les nanoparticules d'argent avec ceux produits par les ions Ag⁺ ;

¹⁷ Munger *et al.*, 2014, cf. paragraphe « toxicité humaine » du présent rapport d'expertise.

¹⁸ Les résultats de toxicocinétique obtenus permettent de définir les organes cibles, les lignées cellulaires pertinentes et les doses.

- d'évaluer l'influence des paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent, tels que la taille ou la dissolution des nanoparticules d'argent, sur leur durée de rétention et leur clairance ;
- de poursuivre les études de toxicité en général, en insistant sur les études chroniques et sub-chroniques ;
- de développer des méthodologies de référence et des méthodes standardisées permettant d'évaluer la dangerosité des nanoparticules d'argent liée à leurs usages ;
- d'approfondir les études concernant les franchissements de barrières biologiques (peau, placenta, hémato-encéphalique, etc.) ;
- de développer les études de neurotoxicité et reprotoxicité, compte tenu notamment du danger potentiel d'une présence d'argent (quelle que soit sa forme) au niveau du système nerveux central ou des organes de la reproduction.

Avant d'envisager d'éventuelles études de cancérogénèse, il serait nécessaire de :

- o consolider les études de génotoxicité *in vivo*, en particulier en utilisant des modèles et des conditions expérimentales appropriées ;
- o de vérifier l'absence de modification épigénétique¹⁹.

Dans le domaine de l'écotoxicologie

Considérant :

- le nombre élevé de publications scientifiques ;
- l'hétérogénéité des résultats publiés, notamment en ce qui concerne les approches expérimentales ;
- la dépendance de la réactivité des nanoparticules d'argent vis-à-vis de leur environnement (présence de cellules, de polymères, de dispersants, d'ions, etc.) ;
- les résultats sur la biodisponibilité et la bioaccumulation des nanoparticules d'argent ;
- les effets biologiques constatés chez tous les organismes aquatiques et terrestres étudiés aux doses testées ;

le CES recommande :

- de poursuivre des études d'écotoxicologie en milieux complexes, notamment afin de prendre en compte l'impact du milieu environnemental sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent et notamment sur leur spéciation ;
- de conduire des études dans des conditions se rapprochant le plus de celles auxquelles le milieu environnemental est susceptible d'être soumis hors situation accidentelle (e.g. concentrations et durée d'exposition) ;
- de poursuivre les études visant à localiser les nanoparticules d'argent dans les organismes (organes, cellules), de prendre en compte les caractéristiques biologiques des différentes espèces et les différentes voies d'exposition (eau, sols, sédiment, nourriture) dans l'évaluation des risques écotoxicologiques liés aux nanoparticules d'argent ;
- d'étudier leur transformation dans les organismes (ex : influence des sucs digestifs) ;
- d'identifier les mécanismes responsables de leur toxicité, en utilisant par exemple des biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique (sub-organismal, organisme, population) ;

¹⁹ L'épigénétique est définie comme « l'étude des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose, mais ne découlent pas de modifications dans la séquence de l'ADN » Deltour, S., Chopin, V. and Leprince, D., (2005) - Modifications épigénétiques et cancer, Médecine/Sciences 21, 405–411.

- de renforcer les études portant sur le transfert des nanoparticules d'argent dans les réseaux trophiques et de prendre en compte le transfert de toxicité dans la chaîne alimentaire ;

Concernant l'activité antibactérienne et la résistance bactérienne

Considérant :

- le nombre élevé de publications scientifiques et le rapport du Scenihp de décembre 2013 sur les nanoparticules d'argent ;
- l'hétérogénéité des résultats de la plupart des travaux publiés ;
- la dépendance de la réactivité des nanoparticules d'argent vis-à-vis de leur environnement (cellules, polymères, dispersants, ions, etc.) et de la présence d'impuretés dues aux procédés de fabrication ;
- les progrès sur la compréhension des modes d'action respectifs des nanoparticules d'argent et de l'ion argent sur l'activité antibactérienne en laboratoire ;
- la capacité d'adaptation des bactéries à l'ion argent monovalent et les résistances croisées à certains antibiotiques en laboratoire ;
- les difficultés à déterminer les mécanismes d'action de résistance de l'argent sous sa forme nanoparticulaire ;

le CES recommande :

- de renseigner systématiquement, et le plus précisément possible, les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent associées à l'état brut (impuretés de synthèse incluses) ou après leur dispersion en solution colloïdale (présence de co-formulants ou de tensio-actifs). Ces informations essentielles permettent l'interprétation et la comparaison des résultats d'études sur l'activité antimicrobienne en différenciant l'effet des nanoparticules d'argent de celui de l'ion argent ;
- de développer des outils et des protocoles standardisés pour évaluer des niveaux de résistance et garantir l'interprétation des résultats, et faciliter les comparaisons inter-études ;
- de mener des études sur la résistance bactérienne en milieu naturel tout comme des études épidémiologiques pour évaluer la prévalence de gènes de résistance bactérienne à l'argent ;
- d'engager des recherches permettant d'évaluer le transfert de gène de résistance et leur propagation ;
- d'étudier la stabilité des paramètres physicochimiques (en particulier dissolution et spéciation) en fonction du milieu (présence d'ions, de protéines, de dispersants, etc.) et de leur évolution dans le temps et des étapes du cycle de vie de ces nanoparticules d'argent.

En matière d'encadrement réglementaire

Considérant :

- l'absence, à l'heure actuelle, d'un inventaire permettant d'assurer la traçabilité des nanoparticules d'argent tout au long de leur cycle de vie ;
- l'insuffisance et le caractère lacunaire des données d'exposition disponibles sur les nanoparticules d'argent et sur les produits en contenant ;
- l'hétérogénéité des définitions adoptées pour la prise en compte de la spécificité des nanomatériaux dans les réglementations existantes ;
- l'entrée en vigueur, depuis le 1er janvier 2013, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-8 du Code de l'environnement, de la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire fabriquées, importées ou distribuées sur le territoire français et l'absence

de déclarations de substances à l'état nanoparticulaire à base d'argent pour l'année 2013 en France ;

- le caractère insuffisant, voire inexistant, des informations destinées aux consommateurs et à la population générale (étiquetage et/ou informations issues de la déclaration obligatoire) en application des réglementations existantes ;
- la difficulté persistante à différencier les effets qui sont dus à l'ion argent de ceux que l'on peut directement imputer aux nanoparticules d'argent (voire leurs effets combinés quand ils sont tous les deux présents) ;

le CES recommande :

- d'entreprendre des travaux visant à comprendre l'absence de déclaration de nanoparticules d'argent en France en 2013 ;
- de réviser, en cas de défaut de déclaration avéré, les modalités de l'obligation de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire afin de pouvoir identifier, évaluer la quantité et déterminer les usages des nanoparticules d'argent produites, importées et distribuées à tous les utilisateurs, *a minima* pour le territoire national, dans le cadre suivant :
 - o extension aux distributeurs de produits grand public (en complément des distributeurs à destination des utilisateurs professionnels) ;
 - o amélioration de l'information du public en limitant les possibilités de confidentialité ;
- de travailler à l'évolution de la déclaration obligatoire afin de demander aux déclarants de fournir des données complémentaires concernant les nanoparticules d'argent déclarées (concentration, informations disponibles sur la toxicité, etc.). Par ailleurs, les fiches de données de sécurité devraient être enrichies par des informations adaptées au statut nanométrique de l'argent, pour les différentes étapes du cycle de vie des produits. L'ensemble de ces informations pourrait être recensé dans une base de données à accès public ;
- d'engager des études visant à évaluer l'intérêt et l'impact de la mise en place d'obligations d'étiquetage dans des réglementations sectorielles (ex : cosmétiques), afin de mesurer la pertinence d'une extension de telles obligations dans le cadre de réglementations plus larges et la cohérence entre cet éventuel étiquetage et les données issues de la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire ;
- d'étudier la faisabilité de limiter le recours aux nanoparticules d'argent aux usages essentiels, en :
 - o favorisant les produits sûrs dépourvus de nanoparticules d'argent et équivalents en termes de fonction et d'efficacité ;
 - o restreignant le recours aux produits susceptibles de libérer des nanoparticules d'argent ou des espèces chimiques pouvant présenter un risque pour l'homme ou pour l'environnement au cours de leur utilisation, sous contraintes d'usage normal et en fin de vie. Le critère de persistance dans l'environnement devrait être également pris en compte, dans l'éventualité d'un impact à long terme ;
 - o restreignant le recours aux produits dont l'utilité démontrée serait faible pour les consommateurs, sur la base d'une analyse socio-économique.

Date de validation de la synthèse par le comité d'experts spécialisé : 20 juin 2014.

Sigles et abréviations

AAS : *Atomic Absorption Spectroscopy* - Spectroscopie d'absorption atomique

ACV : Analyse du cycle de vie

ADN : Acide désoxyribonucléique

AES : *Atomic Emission Spectroscopy* - Spectrométrie d'émission atomique

Afsset : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

Afssa : Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation

AFM : *Atomic Force Microscopy* - Microscopie à force atomique

Anec : Association européenne pour la coordination de la représentation des consommateurs auprès de la standardisation (*European Association for the Co-ordination of Consumer Representation in Standardisation AISBL*)

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

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

Beuc : Bureau européen des unions de consommateurs

BfR : *Bundesinstitut für Risikobewertung* - Institut fédéral allemand d'évaluation des risques

BPL : Bonnes pratiques de laboratoire

CES : Comité d'experts spécialisé

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CRP : *C-reactive protein* - Protéine c réactive

EELS : *Electron Energy Loss Spectroscopy* - Spectroscopie des pertes d'énergie

DC-FDA : 2', 7' dichlorodihydrofluoresceine diacétate

DPPC : Dipalmitoyl phosphatidylcholine

DGS : Direction générale de la santé

DGT : Direction générale du travail

DGAL : Direction générale de l'alimentation

DGCCRF : Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes

DGPR : Direction générale de la prévention des risques

DLS : *Dynamic Light Scattering* - Diffusion dynamique de la lumière

DRX : Diffraction des rayons X

EDS ou EDX : *Energy Dispersive X-ray spectrometry* - Spectrométrie par dispersion d'énergie

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

EXAFS : *Extended X-Ray Absorption Fine Structure* - Spectrométrie d'absorption des rayons X

FFF : Fractionnement par couplage flux-force

FSH : *Follicle Stimulating Hormone* - hormone folliculo-stimulante

GSH : Glutathion

GT : Groupe de travail

ICP-MS : *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* - Spectrométrie de masse par torche à plasma

ICP-AES : *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy* - Spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma

ICP- OES : *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry* - Spectrométrie optique de photons couplée à une source de plasma

IP : Intrapéritonéal

ISE : *Ion Selective Electrode* - Électrode sélective de l'ion Ag⁺

IV : Intraveineux

LBA : Liquide broncho-alvéolaire

LH : *Luteinizing hormone* - Hormone lutéinisante

MET : Microscopie électronique à transmission

MEB : Microscopie électronique à balayage

MNPCE : *Micronucleated polychromatic erythrocytes* - Érythrocyte polychromatique micronucléé ()

MR : Matériau de référence

MRC : Matériau de référence certifié

NP(s) : Nanoparticule(s)

NPs-Ag : Argent sous forme de nanoparticules

NMs : Nanomatériaux manufacturés

NTA : *Nanoparticle Tracking Analysis* – Analyse du suivi individuel de nanoparticules

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

OES : *Optical emission spectrometry* - Spectrométrie d'émission optique

ORDIMIP : Observatoire régional des déchets industriels en Midi-Pyrénées

PBS : *Phosphate Buffer Saline* - Tampon phosphate salin

PVP : Polyvinyl pyrrolidone

Rapport PCE/NCE : rapport érythrocytes polychromatiques / érythrocytes normochromatiques

RE : réticulum endoplasmique

SAXS : *Small Angle X-rays Scattering* - Diffusion de Rayons X aux petits angles

Scenihr : *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* - Comité Scientifique d'évaluation des risques sanitaires émergents ou nouveaux

SOD : Superoxyde dismutase

STEP : Station d'épuration des eaux usées

WWI : *Woodrow Wilson International Centre for Scholars*

XANES : *X-ray Absorption Near Edge Structure* - Spectroscopie d'absorption X

XPS-UPS : *X-Ray photoelectron spectrometry – Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy* - Spectrométrie de photo-électrons X ou UV

Liste des tableaux

Tableau 1: comparaison des rapports des deux agences (Anses et BfR) sur les nanoparticules d'argent....	29
Tableau 2 : Nano-produits identifiés contenant des nanoparticules d'argent en France	33
Tableau 3 : Synthèse métrologique des principales techniques de caractérisation utilisées	47
Tableau 4 : Recensement des principales techniques de caractérisations utilisées	48
Tableau 5 : Mécanismes d'action des nanoparticules d'argent	89
Tableau 6 : Propriétés des nanoparticules d'argent utilisées dans la publication de Samberg <i>et al.</i> (2010).	157

Liste des figures

Figure 1 : Schéma montrant l'absorption des nanoparticules d'argent, les voies de transport intracellulaires et les cibles cellulaires (d'après Bartłomiejczyk et al, 2013).....	56
Figure 2 (Kermanizadeh, Vranic <i>et al.</i> 2013).....	159
Figure 3 : Fréquences de réticulocytes micronucléés 48 h après administration par voie intrapéritonéale de 3 mg/animal de différentes nanoparticules d'oxyde métallique (d'après Song <i>et al.</i> , 2012) ^a	162

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Généralités

Les nanomatériaux sont le plus souvent considérés comme des objets constitués de structures élémentaires dont au moins une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nanomètres (nm). En réalité, cette définition n'est pas suffisante pour décrire toute la complexité de leur réalité physico-chimique. Les définitions proposées font encore l'objet de nombreuses discussions scientifiques, réglementaires, institutionnelles²⁰ ainsi qu'au sein de la société civile Anses (2014) et ne sont, selon le groupe de travail de l'Anses « Nanomatériaux et santé – alimentation, environnement, travail » en charge de la présente expertise, pas satisfaisantes en l'état dans le cadre de l'évaluation des risques. Aucune définition actuelle ne prend ainsi en compte certains paramètres importants comme la solubilisation (amener une substance à l'état de solution ou de suspension colloïdale) ou la taille moyenne des agglomérats et agrégats. La connaissance de ces paramètres participe pourtant à la compréhension des mécanismes d'action des nanomatériaux sur le vivant. Aussi, le groupe de travail a-t-il choisi de ne pas privilégier une définition particulière des nanomatériaux parmi l'ensemble de celles déjà publiées.

Lorsqu'ils sont fabriqués intentionnellement, les nanomatériaux sont appelés « manufacturés ». Dans le présent rapport, les produits de consommation dans lesquels sont intégrés des nanomatériaux seront désignés par le terme « nano-produits ».

En raison de la grande diversité de leurs propriétés physiques, chimiques ou biologiques, les nanomatériaux trouvent aujourd'hui des applications dans de nombreux secteurs d'activités industrielles. Les inventaires mis en œuvre par les autorités publiques et les acteurs privés, à l'échelle nationale comme internationale, depuis plusieurs années, montrent en dépit des fortes incertitudes liées à la difficile traçabilité des nano-produits un accroissement du nombre de produits de consommation contenant des nanomatériaux manufacturés.

L'analyse de l'inventaire (non exhaustif) des produits disponibles sur le marché français réalisé par l'Anses en 2010 a notamment montré l'existence d'un grand nombre d'applications utilisant des nanoparticules d'argent, sous forme agrégée, agglomérée ou encore colloïdale. Ces nanoparticules sont souvent recouvertes en surface (enrobées) par des ions (citrates), ou encore des molécules (cystéine) ou des polymères (polyvinylpyrrolidone). L'intégration de nanoparticules d'argent dans ces articles commerciaux est réputée répondre principalement à des finalités antibactériennes et antifongiques. De nombreux domaines d'application sont ainsi concernés, parmi lesquels on peut citer l'alimentation (additifs et emballages alimentaires, revêtement de réfrigérateurs), les textiles (vêtements, literie), ou encore les produits de cosmétiques et d'hygiène (brosses à dents, fers à lisser les cheveux, sprays désinfectants, etc.).

Si la présence de nanomatériaux dans un certain nombre de produits de consommation est avérée et fait aujourd'hui l'objet de réglementations spécifiques au niveau européen, les nanoparticules d'argent, quant à elles, ne sont pas expressément visées et le bilan de la première année de mise en œuvre de l'obligation de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire française témoigne des difficultés rencontrées par les pouvoirs publics pour les recenser, puisqu'aucune déclaration

²⁰ Cf. Réunion du 19 Mars 2014 portant sur la révision par la Commission européenne de la définition du terme « nanomatériaux ».

<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/31515/1/lbna26567enn.pdf>.

<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/towards-review-ec-recommendation-definition-term-nanomaterial-part-2-assessment-collected?search>.

n'a été déposée à leur sujet en dehors d'une activité de recherche et développement (Ministère du Développement 2013).

La production et l'utilisation croissantes des nanomatériaux dans des produits de consommation courante soulèvent de multiples interrogations sur leurs risques potentiels pour la santé humaine et pour l'environnement :

- les propriétés intrinsèques particulières de ces nanomatériaux conditionnent-elles des comportements singuliers dans l'organisme et dans l'environnement et une toxicité spécifique (passage des barrières naturelles de l'organisme, bio-persistance, toxicité systémique, etc.) ?
- comment caractériser de manière fiable l'exposition humaine et environnementale ?

1.2 Contexte de la demande

Dans son avis n° 024/2010 du 28 décembre 2009, l'Institut fédéral allemand d'évaluation des risques (*Bundesinstitut für Risikobewertung* - BfR) a indiqué qu'il n'était pas encore possible d'évaluer les risques sanitaires liés aux nanoparticules d'argent. Il a alors recommandé aux fabricants de renoncer à l'utilisation d'argent ou de composés d'argent à l'échelle nanométrique dans les produits alimentaires et les produits de consommation courante²¹ jusqu'à ce que les données disponibles permettent d'évaluer définitivement les risques sanitaires et que l'innocuité sanitaire de ces produits soit garantie. Le BfR a réitéré cette recommandation dans un communiqué publié le 10 juin 2010.

Certains industriels ont alors objecté que, selon eux, les données étaient suffisantes pour réaliser une évaluation des risques liés à l'utilisation des nanoparticules d'argent dans des produits de consommation et dans les aliments. Aussi, le BfR a organisé un atelier réunissant différentes parties prenantes intéressées (experts scientifiques, associations, industriels) pour discuter de la connaissance actuelle des risques afin d'envisager les options possible à mettre en place pour assurer une protection adéquate des consommateurs. À l'issue de cette réunion, le président du BfR a maintenu la position de son agence (12 avril 2011).

De son côté, à la même période, l'Anses²² a publié deux rapports sur l'évaluation des risques des nanomatériaux : « Nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale » (Afssa 2009) et « Nanomatériaux et produits de consommation »²³ (Afsset 2010). Devant le manque de données concernant la dangerosité potentielle des nanomatériaux, l'Anses a conclu à l'impossibilité de caractériser le risque associé aux produits contenant des nanomatériaux. Dans son avis du 17 mars 2010 portant sur l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement, l'Anses recommandait alors de limiter l'exposition des consommateurs et de l'environnement aux nanomatériaux [...] « par la réduction de l'exposition des consommateurs aux produits contenant des nanomatériaux manufacturés et de leur dissémination dans l'environnement, dans le cadre d'une approche graduelle, notamment :

- en favorisant les produits sûrs et équivalents en termes de fonction, d'efficacité et de coût dépourvus de nanomatériaux ;
- en restreignant le recours aux produits dont l'utilité démontrée serait faible pour les consommateurs, par exemple sur la base d'une analyse socio-économique de type bénéfice/risque ;

²¹ Plastiques au contact des denrées alimentaires, additifs alimentaires, procédés de traitement des eaux et produits cosmétiques.

²² L'Afsset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail) et l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation) ont fusionné le 1^{er} juillet 2010 pour créer l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses).

²³ À noter que l'Agence a publié en février 2008 un rapport sur les « nanoparticules manufacturées dans l'eau », qui recense notamment un certain nombre d'utilisations de nanoparticules d'argent dans des applications de filtration d'eau : Afssa (2008) Les nanoparticules manufacturées dans l'eau. Afssa, Maisons-Alfort.

- en restreignant le recours aux produits susceptibles de libérer des nanomatériaux 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 ;
- en limitant dès aujourd'hui aux usages essentiels le recours aux nanomatériaux pour lesquels des alertes de danger ont été identifiées ».

Enfin comme l'avait déjà souligné auparavant le BfR dans ses avis, l'Agence a pointé la nécessité d'engager des recherches pour acquérir les connaissances nécessaires à l'établissement de conclusions solides quant aux risques pour l'homme et l'environnement.

1.3 Objet de la saisine

À la suite de la publication puis de la réitération des recommandations du BfR en 2010, la direction générale de la santé (DGS), la direction générale du travail (DGT) ainsi que la direction générale de l'alimentation (DGAL), la direction générale de la prévention des risques (DGPR) et la direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) ont saisi l'Agence le 10 août 2011 (*cf.* annexe 1).

La demande formulée dans cette saisine intitulée « Mise à jour de l'expertise relative à l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale, pour l'alimentation et pour l'environnement : cas particulier du nano-argent » porte :

- dans un premier temps, sur l'analyse des différences éventuelles existantes entre les connaissances scientifiques sur lesquelles se sont fondés les travaux du BfR d'une part et ceux de l'Anses d'autre part, en 2009 et 2010. Ce rapport propose donc une analyse comparée des différences, sur le plan bibliographique, entre le rapport du BfR et celui de l'Anses (phase 1) ;
- dans un deuxième temps, sur une éventuelle révision par l'Anses de son avis sur l'utilisation des nanoparticules d'argent. Compte tenu de nouvelles publications scientifiques parues depuis les rapports de l'Anses et du BfR, l'Agence propose une mise à jour de l'évaluation des risques liés au nano-argent pour la population générale, pour les travailleurs, pour l'alimentation et pour l'environnement (phase 2). Ce travail d'expertise a été confié au groupe de travail pérenne « nanomatériaux et santé – alimentation, environnement, travail » de l'Anses.

1.4 Modalités de traitement :

L'expertise présente a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) », avec pour objectif le respect des points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Dans le domaine de l'activité antibactérienne et de la bactériorésistance, le groupe de travail s'est appuyé sur les compétences scientifiques de deux agents de l'Anses : un spécialiste de la direction des produits réglementés ainsi qu'un expert rapporteur du laboratoire de Fougères de l'Anses.

Les travaux d'expertise ont été présentés au Comité d'experts spécialisé (CES) « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements », tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques, qui les a commentés lors des séances du 28 mars et du 14 mai 2014. Les travaux ont été adoptés par ce CES lors de la séance du 14 mai 2014.

2 Méthodologie d'expertise

La présente mise à jour des connaissances sur les risques potentiels liés à l'usage des nanoparticules d'argent s'appuie sur la revue bibliographique issue des travaux du rapport de l'Anses publié en 2010, complétée par la littérature relative aux nanoparticules d'argent diffusée ultérieurement, jusqu'en décembre 2013, ou portant sur de nouvelles voies d'exposition.

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, d'instituts ou d'organisations non gouvernementales (avis du Scenih, rapport du Beuc, Anec).

Compte tenu de l'abondance des publications sur le sujet, une sélection des articles les plus pertinents pour cette mise à jour a été réalisée par les experts du groupe de travail. Deux cent quatre vingt articles scientifiques, dans les domaines de la toxicité et de l'écotoxicité des nanoparticules d'argent ont été identifiés grâce aux outils usuels de recherche bibliographique. Six rapports d'études portant sur l'évaluation des risques des nanoparticules d'argent ont été également recensés.

Le domaine « activité bactérienne et bactériorésistance », qui n'avait pas été couvert par l'expertise publiée en 2010 par l'Anses, a été inclus dans ce travail d'expertise ; il a fait l'objet d'une recherche bibliographique débutant avant 2009.

Un chapitre spécifique a été consacré à l'identification des sources d'expositions des consommateurs et de l'environnement aux nanoparticules d'argent, extraites principalement de l'inventaire des nano-produits disponibles sur le marché français réalisé par l'Anses en 2010 pour le rapport « Nanomatériaux et produits de consommation » ((Afsset 2010)) et de l'inventaire du *Woodrow Wilson Centre for Scholars*. La liste non exhaustive réalisée par l'Observatoire régional des déchets industriels en Midi-Pyrénées en 2009 (Ordimip)²⁴ a permis également de compléter le recensement des produits de consommation contenant des nanoparticules d'argent présents sur le territoire français.

Afin de compléter les compétences disponibles dans le groupe de travail, l'Agence a fait appel à deux agents de l'Anses spécialistes du domaine « activité antibactérienne et bactériorésistance ».

²⁴ Les nanoparticules dans les déchets : un chantier à ouvrir ; « *Le savoir : un préalable à la gestion* » (ORDIMIP, octobre 2009).

3 Comparaison bibliographique des rapports du BfR et de l'Anses

Les rapports du BfR et de l'Anses concernant les nanoparticules d'argent répondent à des saisines portant sur des préoccupations différentes : le BfR s'est principalement orienté vers les résistances bactériennes - liées à l'argent au sens large - et le risque alimentaire, alors que l'Anses a étudié le risque lié à l'exposition par voie cutanée et le risque environnemental (cf. Tableau 1). La plupart des références bibliographiques utilisées par les Agences ne sont donc naturellement pas les mêmes : seules 5 publications scientifiques sont communes aux rapports antérieurs des deux Agences.

Le BfR et l'Anses ont souligné l'impossibilité de réaliser une évaluation de risque complète pour la santé et l'environnement lié aux nanoparticules d'argent contenues dans des produits de consommation courante, faute de connaissances scientifiques suffisantes. Les deux Agences estiment cependant que ce risque ne peut, pour autant, être exclu. Enfin, l'Anses a également indiqué que le risque pour l'environnement, en raison du danger avéré chez certaines espèces animales, devait faire l'objet d'une attention particulière.

Si les recommandations portées par le BfR ont pu sembler plus restrictives que celles formulées par l'Anses, il apparaît en réalité qu'elles ne diffèrent pas tant sur le fond mais plutôt sur la forme de leur expression.

L'analyse bibliographique des deux rapports, qui datent d'avant 2010, montre que les deux agences se sont appuyées sur les mêmes connaissances scientifiques. La différence des recommandations formulées s'explique par la différence des préoccupations envisagées par les saisines comme précédemment énoncé (bactériorésistance et alimentation / voie cutanée et environnement).

Tableau 1: comparaison des rapports des deux agences (Anses et BfR) sur les nanoparticules d'argent

	« Utilisation du nano-argent dans les produits alimentaires et les produits de consommation courante » (BfR, 2009)	« Nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale » (Anses, 2009)	« Nanomatériaux et exposition du consommateur » (Anses, 2010)
Nature de l'argent étudié	Sels d'argent, ions Ag, nanoparticules d'argent	nanoparticules d'argent	nanoparticules d'argent
Produit(s) considéré(s)	Additifs alimentaires, MCDA, cosmétiques	Additifs alimentaires (hydrosol d'argent) ; matériaux au contact de denrées alimentaires (MCDA)	Chaussettes antibactériennes
Voie(s) d'exposition considérée(s)	Orale ; cutanée	Orale	Cutanée
Extrait des conclusions	Les données actuellement disponibles ne permettent pas de communiquer une évaluation définitive des risques sanitaires liés à l'exposition du consommateur à ces produits.	Évaluation des risques liés à l'ingestion impossible du fait de données insuffisantes.	Évaluation des risques liés à l'exposition par voie cutanée impossible du fait de données insuffisantes.

Extrait des recommandations	À l'attention des industriels : renoncer à l'utilisation d'argent ou de composés d'argent à l'échelle nanométrique dans les produits alimentaires et les produits de consommation courante jusqu'à ce que les données disponibles permettent d'évaluer définitivement les risques sanitaires et que l'innocuité sanitaire des produits soit garantie.	Développer les travaux de recherche ; Être prudent à l'égard de l'utilisation des nanoparticules en alimentation humaine et animale ; Déclaration systématique de ces substances.	Incitation à la recherche dans les domaines de la caractérisation physico-chimique, de l'évaluation de l'exposition, de la toxicologie ; Mise en place de la traçabilité des données ; Limitation de l'exposition des consommateurs et de l'environnement : favoriser les produits sûrs et équivalents en termes de fonction, d'efficacité et de coût dépourvus de nanomatériaux, restreindre le recours aux produits dont l'utilité démontrée serait faible pour les consommateurs, restreindre le recours aux produits susceptibles de libérer des nanomatériaux ou des espèces chimiques pouvant présenter un risque pour l'homme ou pour l'environnement au cours de leur utilisation et limiter dès aujourd'hui aux usages essentiels le recours aux nanomatériaux pour lesquels des alertes de danger ont été identifiées.
Organisation de l'expertise	Expertise interne pour le rapport et l'avis. Les conclusions et recommandations ont été ensuite discutées au cours de 2 <i>workshops</i> .	6 CES 8 rapporteurs	CES « Agents physiques » GT « nanomatériaux et exposition du consommateur » ; 4 experts rapporteurs

Le BfR, dans ses avis et communiqués de presse, a recommandé aux industriels de renoncer à l'utilisation d'argent ou de composés d'argent à l'échelle nanométrique dans les produits alimentaires et les produits de consommation courante jusqu'à ce que les données soient suffisantes. Cette recommandation de portée générale se fonde principalement sur le risque d'apparition d'une résistance des bactéries à l'argent sous toutes ses formes (métal, oxydes, sels ...). De son côté, l'Anses a formulé des recommandations plus ciblées, préconisant « *une réduction de l'exposition des consommateurs aux produits contenant des nanomatériaux manufacturés ainsi que leur dissémination dans l'environnement, dans le cadre d'une approche graduelle* »²⁵.

²⁵ Voir le rapport d'analyse bibliographique, publié concomitamment au présent rapport.

4 Présence des nanoparticules d'argent dans les produits de consommation

Il n'existe actuellement aucun inventaire officiel²⁶ des produits contenant des nanoparticules d'argent, et l'on ne dispose d'aucune donnée fiable sur la production de nanoparticules d'argent, que ce soit dans le monde ou en France. Faute de données officielles, des sources non réglementaires telles que l'inventaire réalisé dans le cadre du rapport de 2010 de l'Anses, du site du WWI²⁷ et de la liste de produits fournis par l'Ordimp²⁸ ont été utilisées. Ces bases de données permettent néanmoins d'obtenir des informations sur les produits susceptibles de contenir des nanoparticules d'argent en France et dans le monde, sur la proportion qu'ils représentent vis-à-vis des autres nano-produits et sur leurs domaines d'application.

En France, le 1^{er} janvier 2013, la déclaration obligatoire des usages ainsi que des quantités annuelles produites, importées et distribuées sur le territoire français des substances à l'état nanoparticulaire est entrée en vigueur, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-8 du Code de l'environnement.

Les principaux résultats de la déclaration annuelle 2013, qui concernent les substances à l'état nanoparticulaire produites, importées et distribuées en France en 2012, sont les suivants²⁹ :

- 670 entités françaises ont soumis au moins une déclaration ;
- les acteurs français ayant déclaré sont : pour 22 % des importateurs, pour 6 % des producteurs, pour 68 % des distributeurs et pour 4 % d' « autres » acteurs ;
- 282 386 tonnes de substances à l'état nanoparticulaire ont été produites et 212 076 tonnes de substances à l'état nanoparticulaire ont été importées en France en 2012³⁰, soit un total de 500 000 tonnes de substances à l'état nanoparticulaire mises sur le marché en France en 2012.

Ces éléments d'analyse publiés par le ministère du développement durable sur le bilan de la première année de mise en œuvre de l'obligation de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire prévue par les lois Grenelle I et II³¹ semblent néanmoins indiquer que les nanoparticules d'argent ne sont pas fabriquées, importées ou distribuées à des utilisateurs professionnels sur le territoire français.

Bien que l'obligation de déclaration française ne concerne pas directement les produits de consommation courants, on peut légitimement se poser des questions sur la cohérence de la présence de ces produits sur notre territoire référencés dans les inventaires précédemment cités

²⁶ Les inventaires sont réalisés par des associations non-gouvernementales, des universités, des agences, voir par exemple : <http://veillenanos.fr/wakka.php?wiki=RecensementsProduitsNano>.

²⁷ <http://www.nanotechproject.org/cpi/>.

²⁸ Les nanoparticules dans les déchets : un chantier à ouvrir. « *Le savoir : un préalable à la gestion* » (ORDIMP, octobre 2009).

²⁹ Rapport « Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire » publié en novembre 2013 et disponible à l'adresse suivante : http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_public_format_final_20131125.pdf.

³⁰ [Rapport du ministère de l'Écologie du Développement durable et de l'Énergie : « Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire », novembre 2014.](#)

³¹ Loi n°2009-967 du 3 août 2009 de programmation relative à la mise en œuvre du Grenelle de l'environnement (dite Loi Grenelle 1) et Loi n°2010-788 du 12 juillet 2010 portant engagement national pour l'environnement (dite Loi Grenelle 2).

(WWI, Ordimp, Afsset (2010)), sans production, importation et distribution déclarées de nanoparticules d'argent ou de mélanges en contenant sur le marché français.

Bien que la fiabilité de ces inventaires ne soit pas établie, ils constituent, à l'heure actuelle, les seules sources disponibles et, de fait, utilisées par la littérature scientifique aussi bien que par les experts pour tenter d'évaluer l'exposition de la population et de l'environnement aux nanoparticules d'argent en France. Leur analyse critique effectuée par le groupe de travail et exposée ci-dessous illustre les difficultés rencontrées par les acteurs du champ des nanomatériaux pour tenter d'évaluer la présence des nanomatériaux manufacturés dans les produits de consommation.

4.1 Les nanoparticules d'argent dans le monde

Certains auteurs considèrent que la production mondiale est modérée. En Europe, moins de dix tonnes par an de nanoparticules d'argent seraient ainsi produites. Néanmoins, ces estimations s'appuient elles-mêmes sur des données très variables, pouvant s'étendre de 5,5 à 550 tonnes par an (XiaoPiccinno, Gottschalk *et al.* 2012). D'autres sources estiment que la production des nanoparticules d'argent se situerait aux États-Unis entre 2,8 et 20 tonnes par an (Hendren, Mesnard *et al.* 2011).

Selon la base de données du WWI, 1668 nano-produits présents dans le monde entier ont été répertoriés en octobre 2013³², ce qui correspond à une augmentation de plus de 25 % depuis 2010. En février 2014, la base de données du WWI référençait 1854 nano-produits.

Selon cette même source, les produits contenant des nanoparticules d'argent, au nombre de 410, représentaient environ 26 % des autres nano-produits recensés. Le plus grand nombre de produits contenant des nanoparticules d'argent est rencontré dans le domaine de la santé, du sport et du bien-être. Ces nanomatériaux sont également présents dans des produits dédiés à l'électroménager, au jardinage ou à la maison ainsi que dans des jouets et, plus largement, dans des produits pour enfants (Quadros, Pierson *et al.* 2013).

Ainsi, aujourd'hui, il est impossible d'évaluer de manière fiable le nombre et la répartition exacte selon le domaine d'application des produits contenant des nanoparticules d'argent ainsi que le volume de production d'argent sous forme de nanoparticules au niveau mondial.

4.2 Les nanoparticules d'argent en France

La répartition des produits de consommation contenant des nanoparticules d'argent sur le marché français présentée ci-après est réalisée à partir de l'inventaire des nano-produits qu'avait réalisé l'Anses, en interne, en 2010. Il recensait les produits finis disponibles sur le marché français (commandes internet incluses) et contenant des nanomatériaux manufacturés lorsque ces derniers étaient revendiqués. Cet inventaire 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. En effet, l'objectif attaché à ce travail d'inventaire était de fournir un support pour la sélection de quelques produits caractéristiques qui ont fait ensuite l'objet d'évaluations de risque. À la suite de cet inventaire, quatre nano-produits avaient été choisis dont des chaussettes contenant des nanoparticules d'argent. Cette base de données n'a pas été mise à jour depuis 2010. Les domaines d'applications les plus souvent rencontrés concernent l'alimentaire, l'électronique et les fournitures pour la maison (filtres, humidificateurs, désodorisants, etc.).

Dans le Tableau 2 construit à partir de l'inventaire de l'Anses, il est à remarquer que :

- le nombre de produits identifiés est faible (21), et il est fort possible qu'il soit plus élevé aujourd'hui ;
- les volumes commercialisés ne sont pas connus.

³² <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>

Tableau 2 : Nano-produits identifiés contenant des nanoparticules d'argent en France

Domaines d'application*	Nombre de nano-produits identifiés	Exemples*
Vêtements / textile	8	Chaussettes, casques
Cosmétiques / hygiène	3	Tétines, sèche-cheveux,
Alimentation	3	Complément alimentaire, emballage, ustensile de cuisine
Fourniture maison	3	Purificateurs d'air, électroménager, filtres désodorisants, landaus,
Électronique	3	Encres, lettres de clavier, revêtements de souris ou de téléphones mobiles
Bâtiment	1	Peintures
Total	21	

* définis par les experts du groupe de travail constitué dans le cadre du rapport « Nanomatériaux et produits de consommation » (Anses 2010).

4.3 Exposition aux nanoparticules d'argent et risques associés

Population en milieu professionnel :

Dans un contexte professionnel, la principale voie d'exposition des travailleurs est l'inhalation. Une autre voie possible importante est la voie cutanée. Il convient de souligner que si la voie d'exposition majeure est l'inhalation, le mécanisme d'épuration du système respiratoire (notamment la remontée par mouvement mucocillaire) conduit indirectement à une exposition par voie orale.

De fait, comme cela a été souligné précédemment, même si aucune déclaration de nanoparticules d'argent n'a été réalisée en France en 2013, on ne saurait exclure l'exposition professionnelle aux produits contenant des nanoparticules d'argent dans le cadre des activités suivantes :

- production et utilisation ;
- intervention et maintenance sur des installations contenant des nanoparticules d'argent ;
- collecte et traitement de déchets.

Pour la population générale :

Au regard des sources aujourd'hui disponibles sur les produits de consommation contenant des nanoparticules d'argent (produits en contact avec des aliments, compléments alimentaires, jouets...), l'exposition par ingestion ne peut pas être exclue :

- soit directement *via* la consommation de produits contenant des nanoparticules d'argent, comme par exemple des compléments alimentaires ou encore dans des procédés de traitement de l'eau ;
- soit indirectement *via* les aliments contaminés du fait du relargage à partir de produits en contact avec les denrées alimentaires (notamment emballages, réfrigérateur,...) en

contenant ou de l'accumulation des nanoparticules d'argent le long des chaînes trophiques³³.

L'exposition par inhalation est possible lors de l'utilisation de produits classés dans la catégorie « fournitures de maison », par exemple avec des aspirateurs, des climatiseurs ou des assainisseurs d'air. Il existe également des sprays désinfectants dont le but recherché est précisément de libérer de l'argent, sous forme de nanoparticule ou sous forme ionique (Quadros and Marr 2011).

On peut aussi envisager une exposition par inhalation en cas d'abrasion ou de détérioration des produits contenant des nanoparticules d'argent, dans le cadre d'activités de loisirs (bricolage, réparation).

De plus, pour la population générale, on peut considérer que l'ensemble des produits contenant des nanoparticules d'argent dans le domaine du textile et de la cosmétique représente un risque d'exposition par voie cutanée.

Pour l'environnement :

L'exposition de l'environnement pourrait provenir de l'ensemble des nano-produits lors de lavages, d'abrasion, ou de destruction/élimination incomplète des produits contenant des nanoparticules d'argent. En effet, il n'existe actuellement aucune réglementation spécifique sur le traitement des nanomatériaux et par conséquent aucune filière de traitement des déchets spécialisée ou adaptée : ils sont pris en charge par des installations classiques qui n'ont pas nécessairement la capacité de les retenir ou de les détruire. Des travaux sont en cours sur l'impact des nanoparticules d'argent dans la filière STEP (stations d'épuration des eaux usées)³⁴ tandis que des études antérieures ont montré que les nanoparticules d'argent (Ag^0) étaient retenues par la biomasse et transformées en nanoparticules de sulfure d'argent (Ag_2S) très peu solubles dans les conditions environnementales classiques en sortie de STEP (Kaegi, Voegelin *et al.* 2011).

Dans le rapport « Nanomatériaux et exposition du consommateur » publié par l'Anses en 2010, un scénario d'exposition de l'environnement a été réalisé à partir de données sur des chaussettes anti-bactériennes contenant et libérant des nanoparticules d'argent dans l'eau lors de lavages. La quantité d'argent sous forme nanoparticulaire rejetée à un niveau national avait été estimée pour ce scénario à 18,72 tonnes par an³⁵.

L'analyse du cycle de vie :

Les émissions et dispersions de nanoparticules peuvent se produire durant les différentes étapes de la vie du produit : la production, la fabrication du produit fini, son utilisation et sa fin de vie. L'« analyse du cycle de vie » (ACV) des produits contenant des nanoparticules d'argent est donc importante car 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.

À la difficulté de réaliser cette ACV s'ajoute la complexité du comportement des nanoparticules dans les différents compartiments de l'écosystème : en effet, le parcours de ces particules est directement influencé par leurs caractéristiques physico-chimiques comme leurs tailles et leurs distributions de taille, leur solubilité, leurs états d'aggrégation, leurs natures chimiques, leurs revêtements, etc.

³³ Chaîne alimentaire constituée d'une succession d'êtres vivants liés entre eux par des besoins nutritifs.

³⁴ travaux de thèse de Lauren Barton, Duke University.

³⁵ page 69 du rapport « nanoamateriauxÉvaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et consommation de l'Ansespour l'environnement » (Anses 2010).

4.4 Niveaux d'exposition aux nanoparticules d'argent

Il existe encore actuellement très peu de données relatives aux niveaux d'exposition des populations aux nanoparticules d'argent, que ce soit en milieu professionnel ou dans l'environnement. Deux tentatives de mesures d'expositions professionnelles ont été publiées par une seule et même équipe en Corée. Dans la 1^{ère} étude, des concentrations atmosphériques d'argent allant de 0,00002 à 0,00118 mg/m³ ont été mesurées dans 2 entreprises coréennes produisant 1 à 5 kg/jour de nanoparticules d'argent (Lee, Kwon *et al.* 2011). Dans la 2^{nde} étude, les concentrations sanguines et urinaires d'argent ont été mesurées par spectrométrie d'absorption atomique chez les salariés exposés aux nanoparticules d'argent (Lee, Mun *et al.* 2012). Quantitativement, leurs taux d'argent dans le sang et les urines se situaient dans une gamme de concentrations similaires à celles trouvées pour une population non exposée. Néanmoins, compte tenu du nombre trop restreint de travailleurs suivis, aucune conclusion ne peut être tirée quant à une éventuelle corrélation entre les niveaux atmosphériques et les résultats biométaboliques. Les résultats obtenus ne peuvent donc en aucun cas être considérés comme représentatifs des niveaux d'imprégnation des travailleurs exposés à l'argent sous forme nanoparticulaire.

Concernant la mesure de l'exposition des consommateurs aux nanoparticules d'argent, il existe encore peu de données. Cinq études portant sur les niveaux d'argent émis par des produits de consommation ont récemment été publiées. Les produits étudiés étaient :

- les textiles (von Goetz, Fabricius *et al.* 2013a) ;
- les emballages alimentaires (Cushen, Kerry *et al.* 2013; von Goetz, Fabricius *et al.* 2013b) ;
- les produits destinés aux enfants (Quadros, Pierson *et al.* 2013) ;
- les sprays contenant des nanoparticules d'argent (Quadros and Marr 2011).

Concernant l'exposition environnementale, les émissions d'argent lors du lavage de textiles contenant des nanoparticules d'argent ont été mesurées dans les eaux de lavage et de rinçage (Lorenz, Windler *et al.* 2012). Des concentrations détectables d'argent de l'ordre de 0,32 à 38,5 mg/l lors du lavage et 0,36 à 22,7 mg/l lors du rinçage ont été mesurés dans 4 des 7 textiles testés. Les études de caractérisation indiquent que l'argent est présent majoritairement sous forme de nanoparticules d'argent agglomérées de taille « globale » supérieure à 450 nm. De la même façon, les niveaux d'argent émis dans les effluents lors d'un cycle de lavage avec une machine à laver utilisant des nanoparticules d'argent pour désinfecter le linge ont été estimés à 11 µg/l, ce qui représenterait, rapporté à l'ensemble de la population norvégienne, 98,5 kg d'argent par an (Farkas, Peter *et al.* 2011).

5 Évolution réglementaire :

Des dispositions spécifiquement dédiées aux nanomatériaux ont été intégrées, depuis 2009, dans plusieurs législations sectorielles de l'Union européenne. Les nanoparticules d'argent sont soumises à ces dispositions.

Le Règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires

L'article 12 du Règlement prévoit que « *Lorsque, s'agissant d'un additif alimentaire déjà inclus dans une liste communautaire, les méthodes de production ou les matières premières utilisées font l'objet d'une modification notable, ou lorsqu'intervient une modification dans la taille des particules, par exemple par l'emploi des nanotechnologies, l'additif produit avec ces nouvelles méthodes ou matières premières est considéré comme un additif différent et une nouvelle entrée ou une modification des spécifications dans les listes communautaires est nécessaire avant qu'il puisse être mis sur le marché.* ».

Le Règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques

L'article 2 du règlement définit la notion de nanomatériau comme « *un matériau insoluble ou bio-persistant, fabriqué intentionnellement et se caractérisant par une ou plusieurs dimensions externes, ou une structure interne, sur une échelle de 1 à 100 nm* ». Le Règlement prévoit par ailleurs, dans ses articles 13 et 16, une procédure de notification particulière³⁶ pour les produits cosmétiques contenant des nanomatériaux, ainsi que la mise à disposition du public, à compter du 11 janvier 2014 au plus tard, d'un « *catalogue de tous les nanomatériaux utilisés dans les produits cosmétiques mis sur le marché, y compris ceux qui sont utilisés comme colorants, filtres ultraviolets et agents conservateurs, mentionnés dans une section séparée, en indiquant les catégories de produits cosmétiques et les conditions d'exposition raisonnablement prévisibles* ». À ces dispositions s'ajoute une nouvelle obligation d'étiquetage des cosmétiques contenant des nanomatériaux, puisque l'article 19 du Règlement prévoit que « *tout ingrédient présent sous la forme d'un nanomatériau doit être clairement indiqué dans la liste des ingrédients. Le nom de l'ingrédient est suivi du mot « nano » entre crochets* ».

Le Règlement (UE) n° 10/2011 de la Commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires

Le règlement établit des exigences spécifiques applicables à la fabrication et à la commercialisation de matériaux et d'objets en matière plastique :

- « qui sont destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires ; ou
- qui sont déjà en contact avec des denrées alimentaires ; ou
- dont on peut raisonnablement prévoir qu'ils entreront en contact avec des denrées alimentaires ».

Les autorisations délivrées aux substances (figurant en annexe I) « *fondées sur l'évaluation des risques de la dimension particulaire classique d'une substance n'englobent pas les nanoparticules* ».

³⁶ Incluant des éléments relatifs à la toxicologie des nanomatériaux utilisés, aux expositions prévisibles et aux données de sécurité.

*artificielles*³⁷ » (considérant 23). Cette discrimination entre substances nanoparticulaires et substances non nanoparticulaires est précisée à l'article 9 du règlement où il est indiqué que « *les substances se présentant sous une forme nanométrique ne peuvent être utilisées que si elles sont expressément autorisées et mentionnées dans les spécifications figurant à l'annexe I* ». Par ailleurs, les dérogations concernant le respect des restrictions et spécifications prévues dans le règlement ou de l'obligation de fabrication avec des substances figurant dans la liste de l'Union développées au bénéfice des substances contenues dans les couches de certains matériaux et objets en matière plastique, lorsque ces substances sont contenues dans une couche en matière plastique qui n'est pas en contact direct avec la denrée alimentaire et qui en est séparée par une couche jouant le rôle de barrière fonctionnelle, ne sont pas applicables aux substances se présentant sous une forme nanométrique (Articles 13 et 14 du règlement).

Le Règlement (UE) n° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires

Le règlement (article 18) prévoit une obligation d'étiquetage spécifique pour les nanomatériaux identique à celle que met en place le Règlement cosmétiques. Elle s'applique cette fois aux ingrédients qui se présentent sous forme de nanomatériaux manufacturés, ces derniers étant définis dans son article 1, comme : « *tout matériau produit intentionnellement présentant une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, ou composé de parties fonctionnelles distinctes, soit internes, soit à la surface, dont beaucoup ont une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, y compris des structures, des agglomérats ou des agrégats qui peuvent avoir une taille supérieure à 100 nm mais qui conservent des propriétés typiques de la nanoéchelle* ».

Les propriétés typiques de la nanoéchelle comprennent :

- i. les propriétés liées à la grande surface spécifique des matériaux considérés; et/ou*
- ii. des propriétés physico-chimiques spécifiques qui sont différentes de celles de la forme non nanotechnologique du même matériau »*

Le Règlement (UE) n° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides

Le Règlement 528/2012/UE comporte plusieurs innovations, dont la création d'une liste de l'Union des substances actives approuvées. Il est précisé à son article 4 paragraphe 4 que « *l'approbation d'une substance active ne couvre pas les nanomatériaux, sauf mention expresse* ». La notion de « *nanomatériau* » est définie d'une manière conforme à la recommandation 2011/696/UE relative à la définition des nanomatériaux.

Un produit biocide ne peut être mis sur le marché ou utilisé qu'à la condition qu'une autorisation ait été délivrée au produit biocide par l'autorité compétente. L'autorisation ne peut être accordée qu'en cas d'évaluation positive des risques présentés par le produit biocide et si les substances actives utilisées dans le produit biocide figurent sur la liste de l'Union des substances actives approuvées. En cas de présence de nanomatériaux dans le produit biocide, l'article 19 du règlement précise que le risque pour la santé humaine, pour la santé animale et pour l'environnement doit être examiné séparément. La procédure d'autorisation simplifiée des produits biocides décrites aux articles 25 et suivants du règlement de 2012 ne peut bénéficier aux produits biocides contenant des nanomatériaux (Article 25 point c).

Les produits biocides autorisés devront indiquer sur une étiquette « *les éventuels nanomatériaux présents dans le produit et les risques spécifiques éventuels qui y sont liés* » (Article 69 paragraphe 2 du règlement) [sous la forme de la mention du nanomatériau suivi du terme « *nano* »]. Cette obligation d'information de la présence de nanomatériaux s'étend aux « *articles traités* » tels que définis à l'article 3 paragraphe 1 I) du règlement. Enfin, dans le cadre de leur

³⁷ Au sens de manufacturés

obligation de surveillance, les États membres devront remettre à la Commission européenne un rapport comprenant en particulier « *des informations sur l'utilisation de nanomatériaux dans les produits biocides et les risques potentiels d'une telle utilisation* » (Article 65 paragraphe 3d).

Enfin, il faut noter que d'autres réglementations européennes traitent des nanomatériaux dans leurs considérants sans toutefois leur consacrer de dispositions particulières. Ces réglementations selon le cas sont également applicables aux nanoparticules d'argent.

Le Règlement (CE) n° 450/2009 de la Commission du 29 mai 2009 concernant les matériaux et objets actifs et intelligents destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires

Selon le considérant 14 du Règlement : « Les systèmes d'emballage intelligents fournissent à l'utilisateur des informations sur l'état des denrées alimentaires et ne doivent pas libérer leurs éléments constitutifs dans ces denrées. Les systèmes intelligents peuvent être placés sur la surface extérieure de l'emballage et peuvent être séparés des denrées alimentaires par une barrière fonctionnelle, c'est-à-dire une barrière située à l'intérieur des matériaux ou objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires empêchant la migration de substances à travers cette barrière vers les denrées alimentaires. Des substances non autorisées peuvent être utilisées derrière une barrière fonctionnelle pour autant qu'elles remplissent certains critères et que leur migration reste en dessous d'une limite de détection donnée. En tenant compte des denrées alimentaires pour nourrissons et autres personnes particulièrement sensibles ainsi que des difficultés de ce type d'analyse où la tolérance analytique est grande, il convient d'établir une limite maximale de 0,01 mg/kg dans les denrées alimentaires pour la migration d'une substance non autorisée à travers une barrière fonctionnelle. Les nouvelles technologies qui produisent des substances à une dimension particulière présentant des propriétés chimiques et physiques sensiblement différentes de celles de particules plus grandes, par exemple sous la forme de nanoparticules, doivent être évaluées au cas par cas pour ce qui est des risques, jusqu'à ce que l'on dispose de davantage d'informations à leur sujet. Par conséquent, la notion de barrière fonctionnelle ne doit pas s'appliquer à ces nouvelles technologies. »

Directive (UE) n° 2011/65 du Parlement européen et du Conseil du 8 juin 2011 relative à la limitation de l'utilisation de certaines substances dangereuses dans les équipements électriques et électroniques

Selon le considérant 14 de la directive, « Dès que des données scientifiques sont disponibles, et compte tenu du principe de précaution, il y a lieu d'examiner la limitation d'autres substances dangereuses, y compris de toutes substances de très petite taille ou caractérisées par une structure interne ou de surface très petite (nanomatériaux) qui sont susceptibles de présenter un danger en raison des propriétés liées à leur taille ou leur structure ainsi que leur substitution par d'autres substances plus respectueuses de l'environnement et garantissant un niveau au moins équivalent de protection des consommateurs. À cette fin, il importe que le réexamen et la modification de la liste des substances soumises à limitations figurant à l'annexe II, soient cohérents, optimisent les synergies et reflètent la nature complémentaire des travaux réalisés conformément à d'autres actes législatifs de l'Union, et notamment le règlement (CE) N° 1907/2006, tout en veillant à ce que la présente directive et ledit règlement s'appliquent indépendamment l'un de l'autre. Il convient de réaliser une consultation des acteurs concernés et de porter une attention particulière aux incidences potentielles sur les PME ».

6 Mise à jour des connaissances relatives à l'activité antibactérienne

Les nanoparticules d'argent et les autres formes d'argent (métal, sels, oxydes...) sont utilisées de nos jours pour leur activité antimicrobienne, et plus particulièrement vis-à-vis des bactéries. Par activité antimicrobienne, il faut comprendre :

- soit un effet inhibiteur de croissance des micro-organismes ;
- soit un effet létal vis-à-vis de ces micro-organismes, cité le plus souvent dans les études sur les bactéries.

L'avis publié par le BfR le 28 décembre 2009 traite plus particulièrement du volet « efficacité antibactérienne », en incluant la résistance des bactéries exposées à l'argent. L'expertise du BfR explore notamment les questions suivantes :

- le besoin d'éclaircissements sur la propagation de cette résistance ;
- la nécessité de disposer de méthodes standardisées pour les études d'efficacité et de résistance ;
- la nécessité de disposer d'études épidémiologiques sur la propagation de cette résistance ;
- la meilleure connaissance des vitesses (cinétiques) de libération de l'argent à partir des produits et biens de consommation ;
- l'apport réel et bénéfique lié à l'utilisation des nanoparticules d'argent dans le cadre de la mise en place de mesures d'hygiène.

En effet, le BfR fait l'hypothèse de l'existence d'une différence de mécanisme d'action selon la nature nanoparticulaire ou non de l'argent : « *L'action antibactérienne des nanoparticules d'argent repose en effet également sur la libération d'ions d'argent. Mais en raison du très vaste rapport surface/volume et des particularités du comportement dans le corps, il est possible que cette dernière induise d'autres mécanismes d'action*³⁸ ».

L'analyse des ressources bibliographiques utilisées dans l'expertise du BfR, complétées par celles du Scenihp dans son rapport sur le nano-argent publié en décembre 2013 (Scenihp 2013) permet de mettre en avant un certain nombre de travaux significatifs en matière d'évolution des connaissances. Ceux-ci sont exposés ci-après.

6.1 Considérations préalables sur les caractérisations physico-chimiques des nanoparticules

Un préalable à une analyse précise des travaux sur l'activité antimicrobienne publiés ces dernières années repose tout d'abord sur la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent la plus complète possible, sans oublier les impuretés. Une revue récente (Prabhu *and* Poulouse 2012) attire l'attention sur l'impact des procédés de fabrication, notamment chimiques, sur l'activité et la toxicité des nanoparticules. En effet, les substances chimiques résiduelles (impuretés) peuvent s'adsorber et modifier l'état de surface des nanoparticules d'argent et *in fine* leur activité.

L'étude des impuretés ne se résume pas à l'analyse des seuls résidus présents dans les suspensions de nanoparticules d'argent. El Badawi *et al.* (El Badawy, Silva *et al.* 2011) insistent sur l'importance de renseigner les méthodes de purifications utilisées ainsi que les résultats de contrôles. Dans leur étude, les auteurs montrent que la purification des nanoparticules d'argent

³⁸ Extrait de la traduction commandée de l'Anses concernant le BfR de 2009 écrit originalement en langue allemande.

entraîne une diminution de leur activité bactéricide sur le genre *Bacillus* liée à l'élimination des ions Ag^+ . Ils démontrent également le rôle important de la charge de surface des nanoparticules lors de leurs interactions avec la membrane cellulaire. En particulier, les nanoparticules d'argent chargées négativement seraient moins toxiques que leurs homologues.

De même, les études de Panáček *et al.* (2009) sur des champignons pathogènes du genre *Candida* concluent que la stabilisation des agrégats de nanoparticules d'argent par des tensio-actifs et polymères diminue d'un facteur 4 la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les travaux de Guzman *et al.* (2012) établissent une relation inversement proportionnelle entre l'activité antibactérienne et la taille des nanoparticules entre 9 et 30 nm. Il est à remarquer qu'au cours de ces travaux, la concentration des ions Ag^+ est mesurée tandis que la caractérisation des impuretés de synthèses (type hydrazine ou mélange d'hydrazine plus citrate de sodium comme agents réducteurs, et dodécylsulfate de sodium comme stabilisant) n'est pas effectuée.

Un exemple d'analyses à effectuer est donné dans les travaux de Lavanya, Veenavardhini *et al.* (2013) décrivant quatre niveaux :

1. le suivi par spectrométrie UV de la formation et de la stabilité des nanoparticules d'argent ;
2. la caractérisation par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier des ligands qui recouvrent et stabilisent les nanoparticules d'argent ;
3. la caractérisation par diffraction des rayons X de la structure cristalline³⁹ ;
4. l'évaluation par microscopie électronique de la taille et de la forme des nanoparticules d'argent.

6.2 Impact de l'environnement sur l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est fortement influencée par l'environnement naturel dans lequel se

Bradford, Handy *et al.* (2009) ont mis en évidence, dans une étude en microcosme avec des sédiments marins sur une période de 30 jours, la faible activité antibactérienne de nanoparticules d'argent commerciales (taille moyenne de 58,6 nm). Cette activité négligeable est expliquée soit par la formation de chlorure d'argent, qui piège ainsi les ions Ag^+ présents, soit par un phénomène d'agglomération des nanoparticules d'argent.

Dasari and Hwang (2010) sont arrivés à des conclusions similaires en utilisant des nanoparticules d'argent de 15 et 25 nm en présence d'acides humiques en concentrations de 20 et 40 ppm. Ils précisent que la nature de ces acides impacte également l'activité antibactérienne.

De leur côté, Das, Xenopoulos *et al.* (2012) se sont intéressés à l'activité antibactérienne dans des milieux aquatiques naturels en travaillant sur 9 sites et en utilisant 6 concentrations d'un produit commercial (nanoparticules d'argent de 1 à 10 nm). Ils ont observé qu'au bout de 48 h l'inhibition de la croissance bactérienne persiste pour des concentrations de 1 et 10 ppm tandis qu'une reprise de croissance bactérienne se produit pour des concentrations de 0,05 et 0,1 ppm. Il est aussi observé que la concentration effective en argent mesurée en solution ne correspond seulement qu'à 10 % de la valeur des nanoparticules d'argent ajoutées (valeur nominale). Cette observation s'explique par des effets de piégeage des nanoparticules introduites par les matières organiques et inorganiques. De plus, la concentration d'ions argent mesurée en solution après ultra centrifugation représente moins de 0,04 % de la concentration en argent initiale.

De leur côté, Choi *et al.* (Choi, Clevenger *et al.* 2009; Choi, Deng *et al.* 2008) s'intéressent aux bactéries nitrifiantes des eaux résiduelles et observent une inhibition de la croissance bactérienne plus forte de la part des nanoparticules d'argent (15 +/- 9 nm) comparativement aux ions Ag^+ . L'ion sulfure réduit par ailleurs cette activité antibactérienne en réagissant avec les nanoparticules

³⁹ L'analyse de la spéciation par spectroscopie d'absorption X (XANES) est plus sûre, car la cristallinité de certaines phases n'est pas assurée. Cette technique, qui nécessite d'utiliser un synchrotron, est cependant difficile d'accès.

d'argent. Ceci pourrait s'expliquer par l'affinité de l'ion Ag^+ pour l'ion sulfure (S^{2-}) présent naturellement conduisant à la formation du précipité Ag_2S peu soluble (Levard, Hotze *et al.* 2013).

Fabrega *et al.* (Fabrega, Fawcett *et al.* 2009) ont exposé des nanoparticules d'argent à des *Pseudomonas fluorescens* pendant 24 h, à des concentrations de 0,002 à 2 ppm, à des pH variables, et en présence d'acides humiques comme matière organique. Ils ont observé l'effet neutralisant des acides humiques sur l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent car ils favorisent la désagrégation des nanoparticules (sorte de tensio-actifs) tout en les enrobant. Travaillant ensuite sur *Pseudomonas putida* inclus dans un biofilm en présence d'acides fulviques, ils ont constaté que les nanoparticules d'argent n'ont pas d'effet sur la croissance du biofilm, bien qu'elles soient incorporées dans ce dernier (Fabrega, Renshaw *et al.* 2009). Une étude récente pourrait expliquer ce résultat par une probabilité de collage des nanoparticules d'argent sur des bactéries très faible, résultant de la présence du revêtement (PVP, acide citrique) (Mitzel and Tufenkji 2014; Xiao and Wiesner 2013).

Suivant les travaux de Garcia *et al.* (García, Delgado *et al.* 2012), des concentrations plus élevées en nanoparticules d'argent (130 ppm) sont nécessaires pour obtenir une activité antibactérienne moyenne dans les eaux usées. Dans cette étude, des informations sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent (diamètre moyen 30 nm) sont fournies mais sans précision sur leurs éventuelles impuretés.

Une autre étude (Zhang, Smith *et al.* 2012) a mis en relation l'impact de la qualité des eaux sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent et leur efficacité. La matière organique naturelle de type acides humiques diminue l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent, et la présence d'ions divalents (tel que les ions sulfures) et l'eau de mer impactent l'agglomération des nanoparticules d'argent et au final leur activité antibactérienne. Dans cette étude, il est aussi mentionné que face à ces paramètres interférents, les nanoparticules d'argent enrobées par du PVP sont plus stables que celles recouvertes par de la caséine ou de la dextrine.

Concernant l'évaluation des rejets de l'argent quelle que soit sa forme, des concentrations très faibles d'Ag sous la forme Ag^0 , de l'ordre du nanogramme/L, ont été mesurées dans les eaux de surfaces d'effluents de STEP par l'EMPA⁴⁰ tandis que des concentrations de l'ordre du microgramme/kg ont été mesurées pour les sols et sédiments ayant reçu des boues de STEP.

6.3 Différence de comportement des nanoparticules d'argent versus l'ion Argent

La différence d'activité antibactérienne entre l'ion argent (Ag^+) et les nanoparticules d'argent n'est aujourd'hui pas clairement établie, alors même qu'il existe une large diversité des mécanismes d'action antibactérienne décrits dans la littérature (Reidy, Haase *et al.* 2013). Un premier mécanisme concerne l'adhésion des nanoparticules à la surface des bactéries, perturbant alors les propriétés de la membrane. Un deuxième mécanisme consiste en la pénétration des nanoparticules d'argent à l'intérieur de la cellule bactérienne, produisant alors des dommages létaux sur l'ADN bactérien⁴¹. Un troisième mécanisme impliquerait la dissolution des nanoparticules d'argent en cation argent (Ag^+) qui, en interagissant avec les protéines membranaires des bactéries, altérerait leur fonctionnement. Pour de nombreux auteurs, ce mécanisme d'action est considéré comme prépondérant. Enfin, d'autres auteurs considèrent le stress oxydant comme le mécanisme majeur et relativisent l'importance de la forme (nanoparticulaire ou ionique) ou de la spéciation⁴² de l'argent (Ag^0 ou Ag^+) dans les mécanismes d'action antibactériens. En effet, ils soulignent que le stress oxydant impliquant la production

⁴⁰ Laboratoire Fédéral Suisse d'essai des matériaux et de recherche.

⁴¹ Il s'agit de dommages sur les brins d'ADN qui ne peuvent être réparés et entraînent alors la mort de la bactérie.

⁴² La spéciation correspond à la distribution d'un élément entre ses différentes formes physico-chimiques dans un milieu donné.

d'espèces réactives de l'oxygène s'effectue aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des cellules bactériennes, que l'argent soit sous la forme de nanoparticules ou d'ions.

Des travaux significatifs traitant du mode d'action antibactérien des nanoparticules d'argent peuvent être retenus. Bae *et al.* (Bae, Park *et al.* 2010) ont travaillé sur trois critères : la concentration totale en argent de 0,2 à 1 ppm, le pourcentage en ion monovalent et la taille des particules présentes de 4 à 323 nm. Ils ont ainsi pu établir que si l'activité antibactérienne augmente alors que la concentration en argent total augmente, un équilibre doit être trouvé entre les concentrations en nanoparticules d'argent et ions Ag^+ pour optimiser l'activité antibactérienne. En effet, cette activité augmente lorsque la concentration en Ag^+ se situe dans l'intervalle de 5 % à 24 %. La proportion optimale est trouvée pour le rapport « 25 % Ag^+ / 75 % nanoparticules d'argent » avec une réduction de la population bactérienne de 100 000 fois pour la concentration de 0,8 ppm d'argent. Ainsi, il serait facile de conclure que l'ion monovalent d'argent Ag^+ n'est pas la seule forme efficace, mais le doute demeure. En effet, la présence d'ion argent est mesurée dans le milieu extracellulaire et on ne peut pas exclure la pénétration de nanoparticules d'argent dans la cellule (bactérie) susceptibles alors de libérer à leur tour des ions Ag^+ . Cette étude de bactéricidie a été réalisée sans matières organiques interférentes mais dans du tampon phosphate salin (PBS) sur la souche modèle *Escherichia coli*.

Dans leur étude, Xiu *et al.* (Xiu, Ma *et al.* 2011) ont tenté de distinguer dans le même produit l'effet propre des nanoparticules d'argent (taille variant de 30 à 40 nm) de celui de l'ion argent monovalent. Pour cela, des essais conduits en anaérobiose empêchant la formation d'ion Ag^+ par oxydation des nanoparticules d'argent en argent ionique (Ag^+) démontrent que les nanoparticules d'argent présentent une activité antibactérienne sur *Escherichia coli* 20 fois moins importante que celle attribuée aux ions Ag^+ . Enfin, la présence de faibles concentrations de substances chimiques capables de complexer les ions Ag^+ (ion chlorure, ion sulfure, ion phosphate ou molécule de cystéine) contribue également à la diminution de l'activité antibactérienne des ions argent sans avoir d'impact sur les nanoparticules d'argent. En revanche, après 30 min d'exposition à l'air, l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent est augmentée de 2,3 fois.

6.4 Résistance bactérienne à l'argent :

Le terme « résistance » représente différents phénomènes dont les conséquences ne sont pas de même nature. Ces phénomènes sont décrits dans la littérature :

- un premier phénomène est la résistance naturelle et intrinsèque de certains microorganismes à l'argent inclus dans le spectre d'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent ;
- un deuxième phénomène est lié à la présence d'une barrière physiologique (exopolysaccharides, plus largement des biofilms) limitant ou empêchant l'accès de l'argent sous toutes ses formes aux cellules bactériennes cibles ;
- un troisième phénomène, observé chez de nombreux microorganismes, consiste en leur capacité d'adaptation de manière transitoire ou définitive par régulation de l'expression des gènes ou par mutation; ayant pour conséquence la baisse de leur sensibilité ;
- un quatrième phénomène est la capacité de diffusion des gènes de résistance à l'argent portés notamment par des plasmides. Les deux derniers phénomènes sont à l'origine de résistance croisée ou de co-résistance avec les antibiotiques.

Plus récemment, Khan *et al.* (2011) observent la diminution de sensibilité à l'argent de bactéries isolées d'eaux usées (*Bacillus pumilus*) en plus d'autres bactéries plus courantes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*). Ils expliquent ce phénomène par le rôle physiologique de l'exopolysaccharide des bactéries.

Martinez-Gutierrez *et al.* (Martínez-Gutierrez, Thi *et al.* 2011) a exposé des souches nosocomiales modérément et hautement résistantes aux antibiotiques à des nanoparticules d'argent de 24 nm, synthétisées et caractérisées. Ils constatent que les nanoparticules d'argent inhibent la croissance

de ces souches à Gram + (*Enterococcus faecalis*) et à Gram – (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*)⁴³, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) à hauteur de 1 à 3,5 ppm.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Fayaz *et al.* (2010) concluant à des CMI 10 à 20 fois plus fortes et à une plus grande résistance des bactéries à Gram +. Enfin, une synthèse bibliographique récente (Rai, Deshmukh *et al.* 2012) sur des études réalisées de 2006 à 2011 conclut à l'absence de différence de résistance à l'argent entre souches résistantes ou non aux antibiotiques.

Une étude de Kremer *et al.* (2012) met en relation la pathogénicité de souches d'*Enterobacter cloacae* responsables d'infections nosocomiales dans des services de soins intensifs ou de grands brûlés avec la présence d'un déterminant *sil*⁴⁴ de la résistance à l'argent (Ag⁺). Une hypothèse expliquant le rôle du déterminant *sil* concerne une similarité de composition avec un autre gène (*ibeB*) qui est requis chez *Escherichia coli* pour sa pénétration intracellulaire (dans le corps humain par exemple). Cette double conséquence de contribuer à la survie des bactéries tout en sélectionnant des souches plus pathogènes mériterait d'être confirmée par des travaux plus étendus sur l'impact de l'argent sous toutes ses formes sur la virulence des bactéries.

Mühling *et al.* (2009) ont travaillé quant à eux en présence de sédiments marins et exposé des bactéries pendant 50 jours à des nanoparticules d'argent de 50 nm avec une gamme de concentrations entre 0, 50 et 2 000 µg/L). Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'impact des nanoparticules d'argent sur la résistance à 8 antibiotiques. Au cours de cette étude, aucune corrélation n'a pu être établie entre la résistance et la concentration d'argent utilisée. La complexité des milieux naturels rend difficile l'interprétation de cette étude car la neutralisation de l'argent sous toutes ses formes doit être forte et l'on ignore la quantité d'argent disponible intervenant ou non dans cet effet.

Ces études se heurtent aussi à l'absence de tests standardisés pour la détermination des CMI. Par exemple, il a été observé un écart de 1 à 100 entre les résultats sur des staphylocoques *aureus* résistants ou sensibles à la méthycilline obtenus par Ansari *et al.* (Ansari 2011) déterminant des CMI de 12,5 ppm à 25 ppm, et par Ayala-Núñez *et al.* (2009) déterminant des CMI entre 1 800 et 2 700 ppm.

De leur côté, Hosseini *et al.* (Hosseini, Mirzaii *et al.* 2011) ont recherché la prévalence de gènes associés à la résistance à l'argent à partir de 106 souches⁴⁵ de deux espèces bactériennes, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, isolées sur des plaies de patients (grands brûlés). Les auteurs observent que 14 % des isolats⁴⁶ de *Pseudomonas aeruginosa* résistants à plusieurs antibiotiques possèdent des gènes de résistance à l'argent alors que chez *Staphylococcus aureus* aucun isolat n'en contient. Ces 14 % sont aussi porteurs de gènes de résistance aux aminoglycosides.

Cette étude est à rapprocher des travaux de Loh *et al.* (2009) recherchant la prévalence des gènes (*sil*) dans 33 *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) et 8 staphylocoques à coagulase-négative résistant à la méthicilline (MR-CNS) issus de lésions cutanées ou de cavités nasales humaines ou animales. Seul un gène de résistance à l'argent (*silE*) a été retrouvé dans 2 MRSA et 1 MR-CNS. Ces études montrent que la prévalence des gènes est limitée.

⁴³ Le test de la coloration de Gram (du nom du biologiste Hans Christian Gram) permet de mettre en évidence certaines propriétés de la paroi bactérienne (composition, nombre de parois notamment).

⁴⁴ Séquence génétique, portée le plus souvent par les plasmides bactériens, codant pour les protéines constitutives des pompes à efflux, empêchant ainsi l'entrée du biocide.

⁴⁵ Partie d'une espèce bactérienne différente des autres bactéries de la même espèce par une différence mineure mais identifiable.

⁴⁶ Isolats : population de bactéries isolée d'un milieu spécifique.

Enfin, Hall Sedlak *et al.*(2012) ont décrit un autre mécanisme de résistance à l'argent en construisant une souche d'*Escherichia coli* qui produit un peptide se liant à l'argent au niveau du périplasme⁴⁷.

Sur le volet résistance, il est reconnu aujourd'hui que des bactéries peuvent s'adapter à l'ion argent et qu'un mécanisme ubiquitaire, *i.e.* assez général, basé sur l'utilisation des pompes à efflux, codées par des gènes portés par des plasmides, en est au moins responsable. Cependant, le trop faible nombre d'études sur le terrain ne permet pas d'apprécier un risque quant à la propagation de cette résistance.

6.5 Synthèse et recommandations relatives à l'activité antimicrobienne

L'analyse bibliographique réalisée par l'Agence complétée par les informations fournies par le rapport du Scenihir de décembre 2013 sur les nanoparticules d'argent a permis de mettre en avant un certain nombre de travaux significatifs en termes d'évolution des connaissances.

Sur un plan général :

- s'il existe une différence d'activité de l'ion argent par rapport à celle des nanoparticules d'argent, comme l'a démontré certains travaux, l'origine de cette différence n'est pas encore clairement expliquée ;
- afin de mieux cerner cette question, il faut insister sur l'importance de renseigner le plus complètement possible les procédés de fabrication des nanoparticules d'argent, ainsi que les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent associées à l'état brut (impuretés de synthèses incluses) ou après leurs dispersions (présence de co-formulants ou de tensio-actifs). En effet, ces informations essentielles garantissent l'interprétation et la comparaison des résultats d'études sur l'activité antimicrobienne en différenciant l'effet des nanoparticules d'argent de celui de l'ion argent.

Concernant le mode d'action antibactérien :

- des travaux permettent d'améliorer la connaissance du mode d'action des nanoparticules d'argent en lien avec la présence de l'ion argent monovalent ;
- un rapport massique « 25 % Ag⁺ / 75 % nanoparticules d'argent » semble offrir une activité antibactérienne optimale (pour les caractéristiques des nanoparticules d'argent mises en jeu dans la publication citée plus haut). Toutefois, rien ne permet de généraliser ce résultat ;
- une autre approche a permis de distinguer séparément les activités de l'argent sous la forme ionique et sous la forme nanoparticulaire. Les nanoparticules d'argent apparaissent actives et leur l'activité antimicrobienne est peu dépendante des environnements naturels qui les entourent. En effet, ces environnements contiennent naturellement des ions (chlorure, sulfure, ...) et/ou des molécules (cystéine, ...) susceptibles d'induire des phénomènes de neutralisations de substances chimiques chargées. En revanche, l'activité antimicrobienne de l'ion argent est fortement affectée par ces environnements ;
- l'interférence entre les milieux dans lesquels sont inclus les micro-organismes et le devenir des nanoparticules d'argent lors de leur rejet dans l'environnement a déjà fait l'objet de nombreux travaux. De récents travaux ont démontré la nécessité d'utiliser des concentrations actives de nanoparticules d'argent dans des rapports de 1 à 10 pour conserver les mêmes niveaux d'efficacité. Cela souligne les difficultés, d'une part de prédire l'activité résiduelle des nanoparticules d'argent et d'autre part de standardiser ces phénomènes fortement liés à la grande diversité de composition de ces milieux naturels.

⁴⁷ Le périplasme désigne l'espace situé entre les deux barrières perméables sélectives que sont la membrane cytoplasmique (ou membrane interne) et la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif.

Concernant le développement de phénomènes de résistance des bactéries exposées à l'argent, il est important d'attirer l'attention sur cette notion de résistance qui représente différents phénomènes dont les conséquences ne sont pas de même portée :

- un premier phénomène est la résistance naturelle et intrinsèque de certains microorganismes à l'argent inclus dans le spectre d'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent ;
- un deuxième phénomène est lié à la présence d'une barrière physiologique (exopolysaccharides, plus largement des biofilms) limitant ou empêchant l'accès de l'argent sous toutes ses formes aux cellules bactériennes cibles ;
- un troisième phénomène, observé chez de nombreux microorganismes, consiste en leur capacité d'adaptation de manière transitoire ou définitive par régulation de l'expression des gènes ou mutation; ayant pour conséquence la baisse de leur sensibilité ;
- un quatrième phénomène est la capacité de diffusion des gènes de résistance à l'argent portés notamment par des plasmides.

Les deux derniers phénomènes sont à l'origine de résistance croisée ou de co-résistance avec les antibiotiques.

Sur ce volet de la résistance, il est admis que des bactéries peuvent s'adapter à l'ion argent et qu'un mécanisme ubiquitaire comme l'utilisation des pompes à efflux codées par des gènes portés par des plasmides en sont responsable. Cependant, le faible nombre d'études sur le terrain ne permet pas d'apprécier le risque de propagation de cette résistance.

Les études récentes s'intéressant aux différents aspects de cette résistance conduisent parfois à des conclusions en apparence contradictoires et ne fournissent pas de données sur la disponibilité de l'argent, notamment dans les milieux naturels.

Dans ce domaine, le besoin de standardisation nécessaire à une meilleure interprétation de ces phénomènes de résistance est flagrant.

Ce constat rejoint les recommandations du Scenihir sur la définition du terme « nanomatériau » (Scenihir 2010), traitant plus globalement des effets des biocides sur la résistance antibactérienne. Elles suggèrent la mise en place de stratégies de recherches pour :

- le développement d'outils et de protocoles standardisés pour mesurer la résistance, y compris la résistance croisée ;
- l'étude de l'effet de concentrations sub-létales sur l'émergence de résistances aux biocides et aux antibiotiques, prolongée par des expérimentations *in situ* ;
- l'étude de l'impact des biofilms sur ces phénomènes de résistance, y compris de résistance croisée ;
- le transfert de gènes de résistance et leur propagation.

Le rapport du Scenihir sur les nanoparticules d'argent publié en décembre 2013 (Scenihir 2013) insiste également sur le fait qu'aucun document n'est actuellement disponible sur les risques associés à la dissémination de résistance suite à l'utilisation de nanoparticules d'argent.

Bien que la capacité d'adaptation des bactéries à l'ion argent monovalent et les résistances croisées à certains antibiotiques ont été démontrées en laboratoire, sa transposition aux nanoparticules d'argent n'est pas possible à ce jour. En effet, il est toujours difficile d'appréhender le mécanisme d'action réel des nanoparticules d'argent. Par ailleurs, des travaux épidémiologiques, qui aujourd'hui font défaut, devront être entrepris afin de mieux comprendre la réalité du risque d'adaptation des bactéries sur le terrain.

7 Mise à jour des connaissances relatives aux dangers spécifiques des nanoparticules d'argent

7.1 Caractérisation et paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent

7.1.1 Paramètres physico-chimiques généralement retenus

Dans les études publiées depuis 2009, les paramètres physico-chimiques suivants sont régulièrement mentionnés, qu'il s'agisse des études de bactério-résistance, de toxicité ou d'écotoxicité :

- taille des particules et leur morphologie / cristallographie ;
- présence de stabilisants (revêtements de surface), tels que des citrates et la polyvinylpyrrolidone (PVP qui sont le plus couramment employés ;
- présence de dispersants ajoutés volontairement (par exemple le SDBS, Sodium Dodécyl Benzène Sulfonate), ou non. Dans ce dernier cas, ces dispersants sont souvent présents dans le milieu d'exposition et dépendent fortement de la voie d'exposition (par exemple, le DPPC, dipalmitoyl phosphatidylcholine) est un tensioactif pulmonaire ; les substances humiques sont souvent présentes dans les milieux aquatiques, en concentration relativement variable) ;
- pH (fluide gastrique, lysosomes, milieu environnemental) ;
- présence de sels : les ions chlorures et sulfures en particulier conduisent à la formation de précipités généralement très insolubles dans l'eau. Les ions phosphates jouent aussi un rôle important dans certains milieux ;
- présence de molécules réductrices telles que la cystéine (un acide- α -aminé naturel présent dans la plupart des protéines,) ou plus généralement la matière organique ;
- la charge de surface, qui est généralement mal connue (surtout en conditions réelles d'exposition), et qui joue beaucoup sur la stabilité des suspensions et l'agglomération / agrégation.

Certains articles, moins nombreux, retiennent aussi d'autres paramètres comme le potentiel zêta des suspensions nanoparticulaires. Bien que différents travaux aient suggéré que les ions dissous jouaient un rôle essentiel dans la toxicité des nanoparticules d'argent (Kennedy, Hull *et al.* 2010) et qu'il était nécessaire de caractériser systématiquement la fraction dissoute de toutes les suspensions de nanoparticules d'argent, il faut signaler que cet effort de caractérisation des ions Ag^+ dissous (Bilberg, Hovgaard *et al.* 2011; El Badawy, Silva *et al.* 2011; Kim, Nam *et al.* 2012) reste encore trop rarement accompli dans les études récentes mesurant les effets biologiques. De même, la solubilité des particules, leur état d'agrégation, leur revêtement, ne sont pas encore toujours caractérisés, ni même toujours spécifiés.

7.1.2 Principales techniques de caractérisation utilisées

Le tableau ci-dessous (Tableau 3) résume les principales techniques de caractérisation des nanomatériaux couramment utilisées dans des études de toxicologie, génotoxicologie et écotoxicologie. Ce tableau présente de manière synthétique les mesurandes⁴⁸, les seuils usuels de détection, mais aussi les biais et les limitations de ces techniques.

⁴⁸ Grandeur que l'on veut mesurer.

Tableau 3 : Synthèse métrologique des principales techniques de caractérisation utilisées

Technique/sigle usuel	Informations fournies	Seuils usuels de détection	Biais et limitations
Microscopie électronique à transmission/ MET	Taille et forme des nanomatériaux manufacturés par imagerie, structure cristalline Possibilité de couplage avec EDX, EELS pour accéder à des informations physico-chimiques	En taille : < 1 nm à quelques nm selon les appareils	Les nanomatériaux manufacturés observés ne sont pas forcément représentatifs (lié à l'échantillonnage et au fait qu'on ne peut pas observer l'intégralité d'une grille)
Microscopie électronique à balayage/ MEB	Taille et forme des nanomatériaux manufacturés par imagerie, morphologie, état d'agrégation Idem MET pour EDX, EELS	En taille : quelques nm à quelques 10 nm selon les appareils	Comme en MET, les nanomatériaux manufacturés sont déposés sur un substrat et présentent une agglomération non représentative d'une solution ou d'un matériau nanocomposite
Diffusion dynamique de la lumière/DLS	Diamètre hydrodynamique des nanomatériaux manufacturés	En taille : 1 nm à 10 nm selon les appareils	Imprécis en cas de différentes tailles de nanomatériaux manufacturés (différentes populations) et de particules non sphériques (aiguilles, agglomérats complexes...)
Spectrométrie de masse par torche à plasma/ICP-MS	Concentration en Ag dans un échantillon donné (tissus...)	En concentration: Dosage à 1 µg/l en routine, selon l'appareil jusqu'à ng/l	Ne permet pas de différencier les états chimiques des matériaux (nano, ions...)
Spectrométrie d'absorption ultraviolet-visible / UV-vis	Concentration, type de liaisons chimiques dans une molécule donnée	En concentration: seuil de détection $\sim 10^{-5}$ M	Spectres sensibles au pH de la solution, à la nature du solvant, à la température...
Diffraction des Rayons X/DRX	Structure et nature des phases cristallines (métal, oxyde), taille des cristallites	En taille : imprécis sous 10 nm ?	Taille des cristallites parfois difficile à mettre en relation avec la taille des particules elles-mêmes Calcul de taille valable pour des particules sphériques
XANES et EXAFS	Spéciation et structure	Indépendant de la taille	Accessibilité à des synchrotrons et suivi des effets du faisceau

Après une analyse bibliographique de plus de 200 publications scientifiques, il a été observé que trois techniques de caractérisation des nanoparticules d'argent sont aujourd'hui utilisées dans la plupart des études (cf. tableau 4).

Tableau 4 : Recensement des principales techniques de caractérisations utilisées

Techniques	Références
Microscopie électronique à transmission (MET)	(Arora, Jain <i>et al.</i> 2008);(Asharani, Lianwu <i>et al.</i> 2011) ;(Bilberg, Malte <i>et al.</i> 2010) ; (Chae, Pham <i>et al.</i> 2009) ; (Cong, Banta <i>et al.</i> 2011); (Das, Xenopoulos <i>et al.</i> 2012) ; (Fabrega, Renshaw <i>et al.</i> 2009); (Farmen, Mikkelsen <i>et al.</i> 2012)., (Foldbjerg, Dang <i>et al.</i> 2011) ; (Hackenberg, Scherzed <i>et al.</i> 2011) ; (Kim, Kuk <i>et al.</i> 2007) ; (Kim, Choi <i>et al.</i> 2009) ; (Lim, Roh <i>et al.</i> 2012) ; (Martínez-Gutierrez, Thi <i>et al.</i> 2011) ; (Panacek, Pucek <i>et al.</i> 2011) ; (Park, Neigh <i>et al.</i> 2011) ; (Samberg, Oldenburg <i>et al.</i> 2010) ; (Teodoro, Simões <i>et al.</i> 2011) ; (Liu, Guan <i>et al.</i> 2012) ; (Piao, Kang <i>et al.</i> 2011) ; (Xue, Zhang <i>et al.</i> 2012) ; (Dasari and Hwang 2010); (Choi, Deng <i>et al.</i> 2008); (Cong, Banta <i>et al.</i> 2011); (Croteau, Misra <i>et al.</i> 2011) ; (Foldbjerg, Olesen <i>et al.</i> 2009) ; (Gaiser, Fernandes <i>et al.</i> 2009); (García-Alonso, Khan <i>et al.</i> 2011); (Haase, Rott <i>et al.</i> 2012) ; (Khan, Mukherjee <i>et al.</i> 2011); (Kim, Kuk <i>et al.</i> 2007); (Larese, D'Agostin <i>et al.</i> 2009); (Lee, Nallathamby <i>et al.</i> 2007); (Li, Chen <i>et al.</i> 2012)
Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	
• couplée au MET pour caractériser la taille	(Arora, Jain <i>et al.</i> 2009);(Bilberg, Malte <i>et al.</i> 2010);(Cong, Banta <i>et al.</i> 2011) ; (Foldbjerg, Dang <i>et al.</i> 2011) ; (Lim, Roh <i>et al.</i> 2012);(Martínez-Gutierrez, Thi <i>et al.</i> 2011);(Panacek, Pucek <i>et al.</i> 2011) ; (Park, Neigh <i>et al.</i> 2011);(Teodoro, Simões <i>et al.</i> 2011) ;(Liu, Guan <i>et al.</i> 2012);(Piao, Kang <i>et al.</i> 2011);(Xue, Zhang <i>et al.</i> 2012);(Gaiser, Fernandes <i>et al.</i> 2009);(Haase, Rott <i>et al.</i> 2012);(Lee, Nallathamby <i>et al.</i> 2007);(Li, Chen <i>et al.</i> 2012); (Mukherjee, O'Clonadh <i>et al.</i> 2012); (Navarro, Piccapietra <i>et al.</i> 2008)
• couplée à la microscopie électronique à balayage (MEB)	(Griffitt, Hyndman <i>et al.</i> 2009); (Xue, Zhang <i>et al.</i> 2012) ; (Greulich, Kittler <i>et al.</i> 2009); (Griffitt, Luo <i>et al.</i> 2008)
• couplée à la diffraction des rayons X	(Lowry, Espinasse <i>et al.</i> 2012);(Bilberg, Malte <i>et al.</i> 2010);(Cong, Banta <i>et al.</i> 2011);(Fabrega, Fawcett <i>et al.</i> 2009); (Foldbjerg, Dang <i>et al.</i> 2011)
• utilisée seule	(Kalishwaralal, Banumathi <i>et al.</i> 2009)
Spectroscopie de masse par plasma couplé induit (ICP-MS) et ses dérivées	(Dasari and Hwang 2010);(Gaiser, Fernandes <i>et al.</i> 2009); (Roh, Sim <i>et al.</i> 2009) ; (Das, Xenopoulos <i>et al.</i> 2012);(Fabrega, Fawcett <i>et al.</i> 2009);(Griffitt, Hyndman <i>et al.</i> 2009);(Xue, Zhang <i>et al.</i> 2012);(Park, Bae <i>et al.</i> 2010);(Park, Neigh <i>et al.</i> 2011);(Kim, Choi <i>et al.</i> 2009); (Lee, Kwak <i>et al.</i> 2012) (ICP-AES) ; (Farmen, Mikkelsen <i>et al.</i> 2012)(GC-MS) ; (Bilberg, Malte <i>et al.</i> 2010)(ICP-OES et AAS)]

Techniques	Références
XANES et EXAFS	(Auffan, Bottero <i>et al.</i> 2010); (Levard, Michel <i>et al.</i> 2011; Meyer, Lord <i>et al.</i> 2010); (Yang, Gondikas <i>et al.</i> 2012); (Yin, Cheng <i>et al.</i> 2011); (Kwok, Auffan <i>et al.</i> 2012); (Proux, Biquard <i>et al.</i> 2005) (Proux, Nassif <i>et al.</i> 2006) (Ma, Levard <i>et al.</i> 2014; Ma, Levard <i>et al.</i> 2012) (Levard, Hotze <i>et al.</i> 2013; Levard, Hotze <i>et al.</i> 2012; Liu, Yang <i>et al.</i> 2013); (Reinsch, Levard <i>et al.</i> 2012) (Whitley, Levard <i>et al.</i> 2013)

L'utilisation du MET pour caractériser la taille (diamètre géométrique), la forme (rapport d'aspect) et l'état d'aggrégation / agglomération (granulométrie) des nanomatériaux est maintenant fréquemment évoquée dans les publications, même si une image isolée est souvent peu représentative de la distribution en taille des objets. Quelques articles commencent désormais à présenter une analyse statistique de ces images MET (De Temmerman *et al.* 2012). Néanmoins, il reste très difficile de produire un échantillon à analyser représentatif, car sa préparation pour analyse peut provoquer une modification de sa granulométrie. En particulier, l'utilisation d'ultrasons pour disperser les nanomatériaux avant leur dépôt sur la grille, pour une analyse MET, ainsi que la manière de les prélever, peut conduire à observer une granulométrie distincte de celle initiale. De même, l'étape de séchage du prélèvement sur la grille conduit généralement à une (ré)agglomération des nanoparticules, modifiant encore la granulométrie de l'échantillon. D'autres points cruciaux de la mesure peuvent faire défaut dans les publications scientifiques telles que le protocole de mesure (Tension d'accélération en kV, grandissement, nombre de particules analysées, ...) et les approches analytiques des mesures employées (analyse d'image comme par exemple le seuillage, choix des particules, paramètres statistiques choisis, etc.).

Il est également important de souligner que certaines techniques de mesure ne donnent que des diamètres équivalents, dépendant du principe physique de la méthode d'analyse employée : pour une valeur mesurée (par exemple de mobilité électrique) pour un nanomatériau donné, il est possible de faire correspondre par calcul un diamètre de sphère possédant cette même valeur. Toutefois, les calculs qui sont effectués pour aboutir aux résultats de mesure considèrent alors que les objets mesurés sont similaires à des sphères parfaites, ce qui n'est pas le cas par exemple pour des nanotubes ou des nanofibres.

La technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet d'analyser indirectement la taille et la distribution en taille des nanoparticules (en diamètre hydrodynamique vs %Volume). Néanmoins, cette technique ne peut pas mesurer des distributions fiables et justes dans le cas d'un mélange de différentes tailles de nanomatériaux (différentes populations) et dans le cas de particules non sphériques (aiguilles, agglomérats complexes, etc.). Comme le montre le tableau 4, plusieurs études récentes ont intégré l'importance de disposer d'une caractérisation couplée en DLS et MET.

La technique d'ICP-MS permet d'accéder à la concentration en masse des atomes d'argent (Ag(0) et Ag(I)), et au ratio Ag/Ag⁺ (Bouwmeester, Poortman *et al.* 2011; Gaiser, Fernandes *et al.* 2009; Zhang, Smith *et al.* 2012). Pour les études *in vivo*, la teneur en argent dans le sang ou les organes est souvent déterminée par spectrométrie de masse associée à un plasma inductif d'argon (ICP-MS), comme dans l'étude de De Jong (De Jong, Van Der Ven *et al.* 2013).

En complément ou substitution de ces techniques on peut trouver aussi :

- la spectroscopie d'absorption UV-Visible ou de rayons X (par exemple (Choi, Deng *et al.* 2008; Lee, Nallathamby *et al.* 2007; Singh and Ramarao 2012; Suresh, Pelletier *et al.* 2010; Wang, Wu *et al.* 2012) ;
- la microscopie électronique à balayage (MEB) environnementale (Fabrega, Renshaw *et al.* 2009; Gaiser, Fernandes *et al.* 2009; Greulich, Kittler *et al.* 2009; Singh and Ramarao 2012) ;

- associé au MET ou au MEB, on utilise parfois l'analyse dispersive en énergie pour une analyse chimique (EDS ou EDX pour *energy dispersive X-ray spectrometry*) (Choi, Clevenger *et al.* 2009; Singh and Ramarao 2012) ;
- la diffraction des rayons X (DRX) pour mesurer la taille moyenne des particules (Bilberg, Hovgaard *et al.* 2011; Cong, Banta *et al.* 2011; Gaiser, Fernandes *et al.* 2009; Sung, Ji *et al.* 2011; Suresh, Pelletier *et al.* 2010) ;
- la microscopie à force atomique (AFM) pour la taille des particules (Gaiser, Fernandes *et al.* 2009; Singh and Ramarao 2012) ;
- la spectrométrie de photo-électron X ou UV (XPS-UPS) pour la composition et la chimie de surface des particules, (El Badawy, Silva *et al.* 2011; Gaiser, Fernandes *et al.* 2009) ;
- la diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) (Haase, Rott *et al.* 2012) ;
- la spectroscopie d'absorption atomique (AAS) pour la concentration en ions Ag⁺ (Bilberg, Hovgaard *et al.* 2011; El Badawy, Silva *et al.* 2011; Zhao and Wang 2011) ;
- le Fractionnement par couplage Flux-Force (FFF) pour la taille des particules (Das, Xenopoulos *et al.* 2012) ;
- la Méthode Brunauer, Emmett and Teller (BET) pour mesurer la surface spécifique qui permet également de donner une taille moyenne de particules (Liu, Guan *et al.* 2012) ;
- la spectrométrie d'absorption des rayons X (EXAFS, pour Extended X-Ray Absorption Fine Structure : (Auffan, Matson *et al.* 2013; Lowry, Espinasse *et al.* 2012; Shoults-Wilson, Reinsch *et al.* 2011).

Actuellement, aucune des méthodes décrites ne peut être utilisée de manière isolée pour déterminer tous les paramètres décrivant les nanoparticules. Seule une combinaison de plusieurs méthodes permet de conduire à l'obtention d'une analyse plus juste, fiable et robuste. Il est intéressant de souligner que la plupart des études postérieures à 2009 ont intégré l'importance de la combinaison de plusieurs méthodes citées précédemment. Néanmoins, le manque de méthodes de mesures normalisées, et notamment dans des milieux complexes biologiques, ne permet pas encore d'obtenir des études (éco)toxicologiques fiables (caractérisation de l'accumulation des nanoparticules d'argent dans les tissus). La nano-tomographie X telle qu'existant sur les synchrotrons et maintenant en laboratoire (*cf.* Equipex NanoID) permet d'identifier et localiser les nanoparticules dans des milieux biologiques complexes grâce en particulier à une résolution de 50 nm.

Il est important de souligner le manque de matériaux de référence certifiés (MRC) ou non (MR). Depuis 2013, il existe un seul MRC en taille pour les nanoparticules d'argent sous la référence BAM-N001. Il est disponible auprès de l'institut métrologique allemand BAM⁴⁹ et possède les caractéristiques suivantes : d₅₀ = 18,5 nm ± 2,5 nm (distribution en masse). Deux MR en taille pour les nanoparticules d'argent sont en cours de production au sein de l'institut métrologique des États-Unis NIST⁵⁰ et seront disponibles sous les références suivantes : RM8016 (taille 10 nm) et RM8017 (taille 75 nm) (Orts-Gil, Natte *et al.* 2013).

L'utilisation de ces matériaux de référence permet de s'assurer de la traçabilité des mesures des paramètres physico-chimiques et donc de la comparabilité des études entre elles.

⁴⁹ BAM : *Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung* – Institut fédéral allemand de recherche et d'essai des matériaux.

⁵⁰ NIST : *National Institute of Standard and Technology* – Institut national américain de technologie et de normalization.

Prise en compte de la dissolution des nanoparticules d'argent dans l'eau désionisée et/ou dans les milieux d'exposition

Les caractérisations physico-chimiques sont le plus souvent réalisées dans l'eau désionisée, sur le produit initial. Cependant, de nombreux auteurs caractérisent aussi les nanoparticules dans le milieu d'exposition, essentiellement par MET et DLS.

Toutefois, le suivi de la cinétique de dissolution reste assez rare, que ce soit dans l'eau désionisée (milieu initial) ou dans les milieux d'exposition (Das, Xenopoulos *et al.* 2012; Lee, Kim *et al.* 2012a; Loeschner, Hadrup *et al.* 2011; Miao, Luo *et al.* 2010; Zhao and Wang 2012).

Quelques rares études ont étudié la spéciation de l'argent, souvent en présence d'ajouts contrôlés d'anions (sulfures, chlorures, *etc.*) ou de molécules organiques (matière organique, cystéine) (Choi, Clevenger *et al.* 2009; Farkas, Christian *et al.* 2011; Levard, Michel *et al.* 2011; Liu, Wu *et al.* 2010; Lowry, Espinasse *et al.* 2012; Yang, Gondikas *et al.* 2012; Yin, Cheng *et al.* 2011).

Les méthodes principalement mises en œuvre pour le dosage des ions Ag^+ sont la génération d'ions grâce à la méthode ICP couplée à différents instruments de détection par spectrométrie (MS, OES, AES) et la spectroscopie d'absorption atomique (AAS), après une étape préliminaire de séparation. Cette séparation est réalisée soit par simple filtration (membranes avec une taille de pores adaptée), soit par centrifugation, soit encore dans la plupart des cas par une combinaison des deux (ultracentrifugation sur tubes filtrants avec membrane de dialyse, le plus souvent avec un seuil de coupure autour de 3 kDa).

D'autres méthodes séparatives sont rarement employées, telles que l'utilisation de résines échangeuses d'ions pour éliminer les ions Ag^+ (Kim, Choi *et al.* 2009) ou encore l'extraction CPE (*cloud point extraction*) en présence de Triton TX-114 (Yu, Chao *et al.* 2013).

L'analyse chimique est enfin réalisée (AAS, ICP) après acidification dans la grande majorité des cas avec de l'acide nitrique (HNO_3). Généralement, l'échantillon initial est dissout par une solution d' HNO_3 (détermination de l'Ag total : nanoparticules et argent dissout) puis l'analyse est répétée après filtration afin de déterminer spécifiquement la fraction d'argent soluble (Ag^+).

D'autres méthodes analytiques électrochimiques sont aussi utilisées, mais de façon beaucoup plus anecdotique. Parmi celles-ci on peut citer les suivantes :

- dosage potentiostatique (Bae, Park *et al.* 2010) ;
- électrode sélective de l'ion Ag^+ (Ion Selective Electrode, ISE) (Bae, Park *et al.* 2010; Choi, Clevenger *et al.* 2009; Farkas, Christian *et al.* 2010) ;
- argentométrie par le thiocyanate de potassium, en utilisant le sulfate ferrique d'ammonium en tant qu'indicateur (Singh and Ramarao 2012).

Enfin, les méthodes de caractérisation généralement utilisées sont le MET et la DLS. Des outils associés aux microscopes électroniques tels que l'EDS / EDX sont aussi utilisés en complément par certains auteurs. L'analyse de la taille et la présence de phases additionnelles est fréquemment réalisée par DRX. La mesure de la charge de surface (potentiel zêta), la caractérisation complémentaire de la taille et de la morphologie par AFM et MEB, la mesure de la surface spécifique par BET, la caractérisation de l'état de surface par XPS. D'autres méthodes liées à l'utilisation d'un synchrotron (μXRF , $(\mu)\text{XANES}$, EXAFS) sont très intéressantes au niveau analytique mais leur difficulté d'accès les rend très peu utilisées. La spectrométrie UV-Vis est souvent utilisée aussi pour déterminer la présence résiduelle de nanoparticules d' $\text{Ag}(0)$ (les ions Ag^+ ne donnent pas de signal) dans les filtrats. Enfin, la méthode NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*) est utilisée par quelques rares auteurs (Bouwmeester, Poortman *et al.* 2011; Farkas, Christian *et al.* 2010) et permet de déterminer la taille des particules un peu comme dans le cas de la DLS, avec un principe cependant différent puisque les particules sont suivies par vidéo. Les particules de moins de 40 nm (environ) ne peuvent cependant pas être suivies par cette technique.

7.1.3 Influence des paramètres physico-chimiques sur les effets (éco)toxicologiques

- Influence de la taille

Plusieurs études rapportent que la toxicité des nanoparticules d'argent dépend de leur taille et de leur revêtement de surface (Carlson, Hussain *et al.* 2008; Kim, Kim *et al.* 2012; Liu, Wu *et al.* 2010; Suresh, Pelletier *et al.* 2012) ainsi que de leur dissolution en ions Ag^+ (Suresh, Pelletier *et al.* 2012; Yang, Gondikas *et al.* 2012). La taille des nanoparticules d'argent influence leur mode d'internalisation cellulaire (Kim, Kim *et al.* 2012), tandis que le revêtement de surface semble affecter l'affinité des nanoparticules d'argent pour la surface cellulaire ainsi que la dissolution ou le relargage des ions Ag^+ .

- Influence de la solubilité

La solubilité des nanoparticules d'argent utilisées dans le cadre du programme de parrainage de l'OCDE (NM 300) dans les milieux aqueux est très faible (JRC 2011). Elle est dépendante de la dose mais également de la taille des nanoparticules et de la nature du milieu (Kim, Kim *et al.* 2008). Les nanoparticules de plus petite taille libèrent des quantités plus importantes d'ions Ag^+ impactant alors le niveau de cytotoxicité (Pratsinis, Hervella *et al.* 2013). La solubilité des nanoparticules d'argent a été reliée à la libération d'ions argent qui contribuent à leur toxicité (Fabrega, Luoma *et al.* 2011a; Kim, Kim *et al.* 2011). Les revêtements des nanoparticules d'argent modifient les propriétés de surface et influencent la libération d'ions Ag^+ (Yang, Gondikas *et al.* 2012). En revanche, les travaux de Ma *et al.* (2014) et de Levard, Hotze *et al.* (2013) montrent que la solubilité des nanoparticules d'argent dépend de la taille en suivant la loi de Kelvin modifiée, indépendamment du revêtement initial dans une condition donnée (pH et NaCO_3).

Des études ont comparé les effets provoqués par des nanoparticules d'argent et le nitrate d'argent (AgNO_3), source d'ion Ag^+ . Cette comparaison porte à la fois sur les effets observés et sur l'étude de l'absorption des substances par les cellules. Certains auteurs attribuent alors les effets observés à la seule présence des nanoparticules d'argent (Böhmert, Niemann *et al.* 2012; Kawata, Osawa *et al.* 2009) tandis que d'autres l'attribuent à la simple présence d'ions argent Ag^+ issus de la dissolution des nanoparticules d'argent (Bouwmeester, Poortman *et al.* 2011; Wąsowicz, Cieślak *et al.* 2011). Ainsi, la libération d'ions Ag^+ libres pourrait contribuer en partie, mais pas entièrement, aux effets toxiques observés avec les nanoparticules d'argent (Gaiser, Fernandes *et al.* 2012; Laban, Nies *et al.* 2009). Des études récentes confirment que la toxicité des nanoparticules d'argent est partiellement due à la libération d'ions argent (Gorth, Rand *et al.* 2011; Loeschner, Hadrup *et al.* 2011). La publication de Foldbjerg *et al.* (2012) démontre une différence considérable entre les profils d'expression génique de cellules épithéliales de poumon humain A549 traitées avec des nanoparticules d'argent (plus de 1 000 gènes modulés plus de 2 fois) ou avec des ions Ag^+ (133 gènes modulés plus de 2 fois) bien que ces derniers induisent également un « stress oxydant ». La dose intracellulaire d'ions Ag^+ est plus élevée quand les cellules ont été exposées aux nanoparticules d'argent qu'aux formes ioniques testées sous forme de sels d' AgNO_3 (Cronholm, Karlsson *et al.* 2013). Des processus chimiques et électrochimiques gouvernent le mécanisme de libération des ions Ag^+ à partir des nanoparticules d'argent. La libération d'ions Ag^+ à partir des nanoparticules d'argent provoque la génération d'intermédiaires peroxydes, comme H_2O_2 , qui réagissent rapidement avec les biomolécules ou l'Ag sous forme métallique à la surface des agglomérats de nanoparticules d'argent, entraînant alors la formation d'oxydes ou d'hydroxydes d'Ag. En milieu cellulaire, la pénétration intracellulaire des nanoparticules d'argent semble plus importante que celle des ions Ag monovalent pour une quantité initiale égale. En effet, les ions Ag^+ peuvent former plus facilement des complexes et des colloïdes avec les éléments du milieu cellulaire comme le montrent les résultats obtenus par DLS avec l' AgNO_3 (Cronholm, Karlsson *et al.* 2013). Ces processus compliquent la comparaison directe entre les résultats d'absorption intracellulaire de l'Ag sous forme particulaire et ionique.

La dissolution des ions Ag^+ est rapide dans un fluide gastrique reconstitué *in vitro* (moins de 30 min) mais elle est dans de nombreux cas incomplète *in vivo* à cause du faible temps de résidence des nanoparticules d'argent. Cependant, la concentration en ions Ag^+ libres dans les milieux biologiques est extrêmement faible en raison de la complexation et de la possible

précipitation d'AgCl en présence des ions Cl⁻ (concentration maximale d'espèces Ag solubles dans le fluide gastrique estimée à 0,51 mg/l). La majorité de l'argent en circulation dans l'organisme s'effectue probablement sous forme complexée par des thiols. Même si les sulfides et les sélénides ont une plus forte affinité que les thiols, leur concentration largement plus faible dans les fluides biologiques indique que les cinétiques de liaison favorisent la complexation avec les thiols dans un premier temps. La complexation de l'Ag par les sulfides et les sélénides peut être considérée comme une forme de détoxification en raison de la faible biodisponibilité de l'Ag dans ces produits hautement insolubles (Liu, Wang *et al.* 2012).

- Influence des revêtements

Les revêtements des nanoparticules d'argent altèrent les propriétés de surface et influencent la libération d'Ag⁺ (Yang, Gondikas *et al.* 2012). Si la diminution de la viabilité cellulaire est logiquement dépendante de la dose, il a également été démontré que des nanoparticules d'argent nues sont plus cytotoxiques que des nanoparticules d'argent revêtues (Nguyen, Seligy *et al.* 2013). Ainsi, une mortalité cellulaire est observée dans des macrophages murins (J774A.1) et des cellules intestinales humaines (HT29), pour des concentrations de nanoparticules d'argent de 1 µg/ml contre 25 µg/ml, respectivement sans et avec revêtement. À noter que les nanoparticules d'argent nues ou pas sont visibles à l'intérieur des cellules sur des images MET.

De la même façon, dans certaines études, les nanoparticules d'argent enrobées se sont révélées moins toxiques que l'AgNO₃ (générateur d'ions Ag⁺) pour des concentrations équivalentes en Ag, suggérant que les revêtements peuvent avoir des effets protecteurs, en réduisant la libération d'ions Ag⁺, ou que le mécanisme de toxicité des nanoparticules d'argent est différent (Nguyen, Seligy *et al.* 2013). D'autres auteurs parviennent à la même conclusion avec la démonstration que des nanoparticules d'argent sont non toxiques *in vitro* lorsqu'elles sont abondamment rincées (de 10 à 20 lavages avec une solution tampon phosphate de pH 7,5) ou lorsqu'elles sont enrobées de carbone (Samberg, Oldenburg *et al.* 2010). Les manifestations cytotoxiques incluent un rétrécissement et une déformation cellulaire avec gonflement des mitochondries pour les nanoparticules d'argent nues alors que celles possédant un revêtement provoquent un grossissement et une elongation cellulaire, suggérant alors des mécanismes d'actions différents. Néanmoins, ces observations ne sont pas systématiquement confirmées, et pour certains auteurs, la toxicité des nanoparticules d'argent, même enrobées, est plus grande que celle issue de AgNO₃ (Wang, Ji *et al.* 2014b).

La nature du revêtement des nanoparticules d'argent influe également sur la toxicité. Un revêtement de type polyvinylpyrrolidone (PVP) diminue plus fortement la viabilité des cellules comparée à un revêtement de type citrate. Les nanoparticules d'argent nues à fortes concentrations réduisent le contenu en glutathion (GSH), qui est un anti-oxydant, et augmentent légèrement la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Au contraire, l'exposition aux nanoparticules d'argent revêtues ne provoque pas de changements significatifs en anti-oxydants GSH et superoxyde dismutase (SOD), suggérant que le stress oxydant (en particulier formation d'ERO) n'est pas le mécanisme primaire de toxicité de ces nanoparticules d'argent. Les dommages cellulaires sont alors provoqués par les voies inflammatoires en augmentant la production de certaines cytokines (Nguyen, Seligy *et al.* 2013).

7.1.4 Synthèse et recommandations

À ce jour, les méthodes décrites ci-dessus ne peuvent être utilisées de manière isolée pour caractériser les nanoparticules d'argent de manière fiable. Il est recommandé d'utiliser une combinaison de plusieurs méthodes ou techniques. En particulier, pour déterminer la distribution en taille des nanoparticules d'argent, il est nécessaire d'associer à la mesure par DLS d'autres techniques comme celles de microscopie électronique (MET ou MEB) mais aussi pour la spéciation d'utiliser les techniques synchrotron (XANES, EXAFS). Cette approche de combinaison de techniques permet à l'heure actuelle d'obtenir une cartographie des propriétés physico-chimiques la plus complète possible des nanoparticules caractérisées.

Les incertitudes de mesure (statistiques et systématiques) sont rarement documentées dans les études de caractérisation. Il est pourtant nécessaire de réaliser ce travail pour toute caractérisation afin d'obtenir une mesure juste, fiable et robuste.

L'échantillonnage et le prélèvement sont deux paramètres importants pour l'obtention de caractérisations de qualité, c'est-à-dire pour obtenir la meilleure représentativité de ce qui est mesuré. Ces informations doivent être renseignées lors de la publication d'une étude.

Les caractérisations dans des matrices proches des milieux biologiques ou des organes testés en toxicologie ou écotoxicologie sont encore trop peu nombreuses et doivent être poursuivies, mais doivent également être améliorées afin de mesurer au plus juste l'exposition aux nanoparticules d'argent.

Il est urgent d'obtenir des protocoles de préparation d'échantillons standards et harmonisés afin de pouvoir comparer les études entre elles.

Par ailleurs, l'utilisation de nanomatériaux de référence pour étalonner les appareils de mesures sont indispensables. Cela permet de rendre les mesures traçables métrologiquement et donc de s'assurer de la possibilité de comparer les caractérisations des nanoparticules d'argent entre différentes études.

Enfin, la mesure de la dissolution des nanoparticules d'argent est essentielle pour pouvoir différencier les effets dus à la nanoparticule des effets dus à l'ion. Les études de suivi de la cinétique de dissolution des nanoparticules d'argent doivent être renforcées en prenant en compte les points suivants :

- utiliser des milieux filtrants adaptés qui retiennent les nanoparticules d'argent permettant ainsi la séparation des Ag^+ en retenant les nanoparticules d'argent. Oukarroum *et al.* (Oukarroum, Bras *et al.* 2012) utilisent par exemple comme filtre une membrane dont la taille des pores est de 0,45 μm , ce qui n'est pas adapté à la taille de nanoparticules étudiées ;
- spécifier les conditions de centrifugation en accélération (« g ») et non pas en vitesse (tours/minute) ;
- avant toute analyse (ICP, AAS), s'assurer que tout l'échantillon est sous forme ionique notamment, par traitement acide du type HNO_3 .

Plusieurs études rapportent que la taille des nanoparticules d'argent, leur revêtement de surface ainsi que la capacité à se dissoudre pour libérer des ions Ag^+ contribuent aux effets toxiques observés. L'effet de la taille des nanoparticules d'argent concerne plus particulièrement les processus d'absorption cellulaire. Le revêtement de surface semble affecter l'affinité des nanoparticules d'argent pour la surface cellulaire ainsi que la dissolution ou le relargage des ions Ag^+ . La nature du revêtement des nanoparticules d'argent influe également sur la toxicité. Enfin, la libération d'ions Ag^+ à partir des nanoparticules d'argent peut contribuer en partie, mais pas entièrement, aux effets toxiques observés. La solubilité des nanoparticules d'argent est dépendante de la quantité utilisée, de leur taille et de la nature de l'environnement dans lequel elles sont placées. Les nanoparticules d'argent de plus petite taille libèrent des quantités plus importantes d'ions Ag^+ pouvant alors influencer leur cytotoxicité. La dose d'ions Ag^+ intracellulaire est plus élevée quand les cellules ont été exposées aux nanoparticules d'argent comparativement aux formes ioniques testées sous forme de sels d' AgNO_3 .

À ce jour, il n'est pas complètement élucidé si les ions Ag^+ dissous et/ou la forme nanoparticulaire interagissent avec les composés cellulaires (Asare, Instanes *et al.* 2012; Liu, Guan *et al.* 2012). Certains auteurs concluent que les effets toxiques observés avec les nanoparticules d'argent sont provoqués à la fois par les ions Ag^+ et par la forme particulaire. Il apparaît essentiel de poursuivre les efforts de recherche pour déterminer si la toxicité des nanoparticules d'argent est due à la libération d' Ag^+ ou bien à l'état nanoparticulaire, en d'autres termes, de définir s'il existe un « effet nano » pour les nanoparticules d'argent.

7.2 Effets sur la santé

Dans leurs rapports publiés précédemment, le BfR et l'Anses concluaient qu'il était encore impossible d'évaluer les risques sanitaires liés aux nano-argent compte tenu du manque de données sur la dangerosité de ces nanomatériaux.

Dans son rapport traitant des nanomatériaux contenus dans les produits de consommation paru en 2010, l'Anses a analysé les dangers toxicologiques liés exclusivement aux nanoparticules d'argent. L'Agence a ainsi recensé, sur la période s'étendant de 1970 à 2009, environ 40 publications scientifiques relatant des études de toxicologie générale, de génotoxicité, de cytotoxicité et sur le passage transcutané. Depuis, de nombreuses études ont été publiées.

7.2.1 Comportement / Distribution

7.2.1.1 In vitro

Dans le rapport publié en 2010 par l'Anses, la présence d'agrégats de nanoparticules d'argent à l'intérieur des mitochondries avait été démontrée et était supposée intervenir dans la toxicité mitochondriale et les lésions de l'ADN *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Arora, Jain *et al.* 2008; AshaRani, Low Kah Mun *et al.* 2009). Toutefois, l'Agence n'avait pas pu clairement identifier une voie spécifique d'internalisation cellulaire des nanoparticules d'argent. Les résultats des études *in vitro* publiées alors montraient que les nanoparticules d'argent étaient capables d'entrer dans les cellules, probablement par endocytose (AshaRani, Hande *et al.* 2009; Carlson, Hussain *et al.* 2008; Wei, Tang *et al.* 2010) ou par diffusion passive au travers de la membrane cellulaire (Carlson, Hussain *et al.* 2008).

Depuis, des avancées sur la connaissance de l'internalisation des nanoparticules d'argent dans les cellules ont été accomplies. En effet, des tentatives de localisation des nanoparticules d'argent dans la cellule et la détermination des paramètres physico-chimiques et biologiques influant leur absorption ont été effectuées, comme décrit ci-après.

Voies d'internalisation décrites

Une étude montre que les fibroblastes pulmonaires humains normaux (IMR-90) et des cellules d'un glioblastome humain (U251) internalisent les nanoparticules d'argent par une voie d'endocytose spécifique (clathrine) ou non (macropinocytose) (AshaRani, Hande *et al.* 2009). Dans cette étude, les auteurs ont constaté qu'après une étape d'incubation de 2 h, une période de 48 h est nécessaire pour excréter 66 % des nanoparticules d'argent internalisées, ce qui démontre d'une part, que l'exocytose est significativement plus lente que l'endocytose sur ces types cellulaires et, d'autre part, que les nanoparticules d'argent résiduelles sont probablement localisées dans des compartiments cellulaires inaccessibles (Bartłomiejczyk, Lankoff *et al.* 2013).

Sur des macrophages de souris, deux voies différentes d'internalisation par endocytose sont également décrites (Wang, Wu *et al.* 2012). La première dépend de la clathrine et concerne principalement les nanoparticules d'argent isolées. La seconde dépend de l'actine et concerne plutôt les nanoparticules d'argent sous forme d'agrégats/agglomérats.

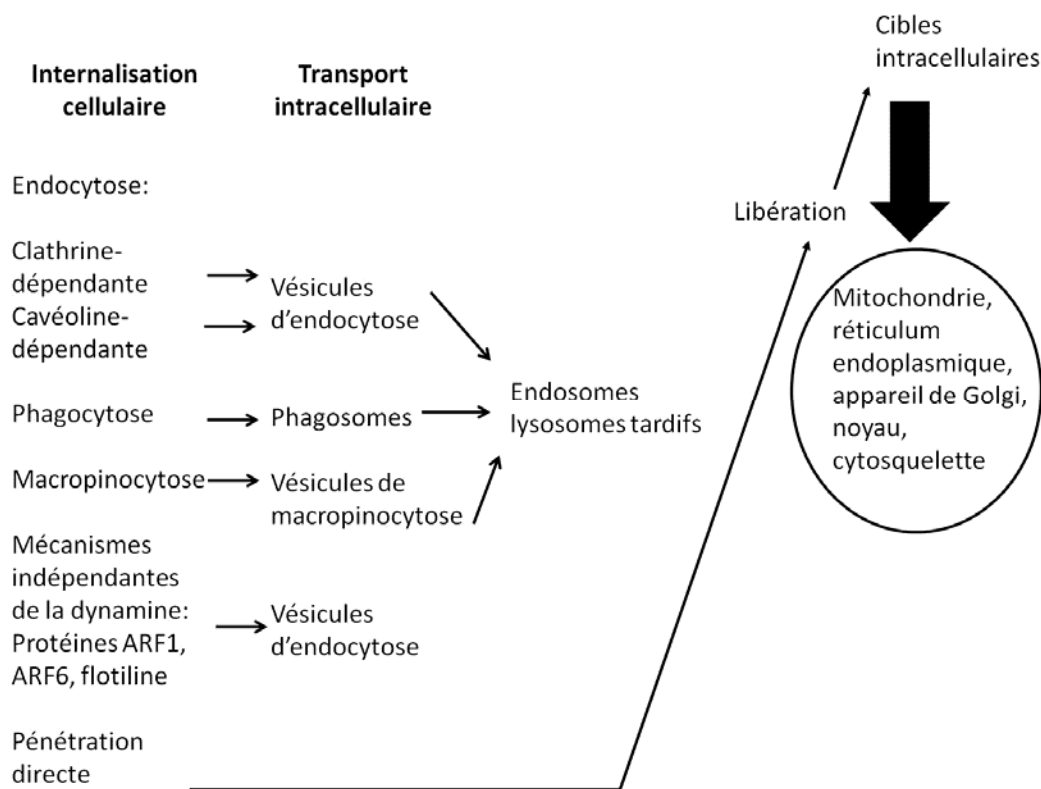


Figure 1 : Schéma montrant l'absorption des nanoparticules d'argent, les voies de transport intracellulaires et les cibles cellulaires (d'après Bartłomiejczyk et al, 2013)

Rôle de la taille

L'entrée des nanoparticules d'argent dans les cellules et leur toxicité subséquente semble dépendre de leur taille (Völker, Oetken *et al.* 2013). Liu *et al.* (2010) ont ainsi montré que les nanoparticules d'argent de plus petite taille (5 nm) pénétraient plus facilement que les nanoparticules d'argent de plus grande taille (20 et 50 nm) dans quatre lignées cellulaires humaines. Un tel effet n'a en revanche pas été observé dans des macrophages murins (cellules J774 A1) traités par 1 et 10 µg/ml de nanoparticules d'argent de 3 tailles différentes (2 à 4 nm ; 5 à 7 nm ; 20 à 40 nm) pendant 24, 48 et 72 heures (Yen, Hsu *et al.* 2009). Dans cette étude, la quantité d'argent devient quasiment nulle après 24 heures et ce, indépendamment de la taille et de la concentration (1 ou 10 µg/ml) des nanoparticules d'argent étudiées.

Il est à remarquer que la taille des nanoparticules d'argent agglomérées est souvent prise en considération lors de l'évaluation de la réactivité ou de la toxicité, tandis que très peu d'études indiquent leur forme (particule, bâtonnet, fibre, etc.).

Rôle du type cellulaire

Une différence d'internalisation des nanoparticules d'argent entre différentes lignées cellulaires telles que des cellules épithéliales humaines de foie (HepG2, C3A), de côlon (HT29), de poumon (A549) a également été mise en évidence. Ainsi, l'absorption des nanoparticules d'argent est plus faible dans les cellules HT29 que dans les cellules A549 et HepG2. Selon Kruszewski *et al.* (Kruszewski, Grądzka *et al.* 2013), la production de mucines par les cellules HT29 pourrait empêcher l'absorption des nanoparticules. Gaiser *et al.* (2012) ont démontré, par microscopie confocale, l'internalisation de nanoparticules d'argent (35 nm) dans des cellules humaines hépatiques C3A (après 2 heures d'exposition) et intestinales Caco-2 (après 24 heures d'exposition). Il apparaît que les cellules intestinales Caco-2 ont internalisé moins de nanoparticules d'argent que les cellules humaines hépatiques C3A. En revanche, l'identification précise du (des) compartiment(s) dans le(s)quel(s) se trouvent les particules n'a pas été possible. Cette étude a également révélé une plus grande absorption de nanoparticules d'argent par rapport à des particules d'argent de taille micrométrique.

Une étude concernant les effets des nanoparticules d'argent sur des lignées cellulaires d'origine cutanée est discutée en annexe 3. Cette étude permet avant tout de comprendre les différences éventuelles d'effet toxicologique concernant l'utilisation de nanoparticules d'argent nues, rincées ou enrobées de carbone (Samberg, Oldenburg *et al.* 2010). Cette étude est mentionnée précédemment dans le paragraphe « Influence des paramètres physico-chimiques sur les effets (éco)toxicologiques » du chapitre 6.

7.2.1.2 Passage de barrières

Rigo *et al.* (2013) ont utilisé des pansements Acticoat TM Flex3, contenant des nanoparticules d'argent de 10 à 15 nm à des concentrations de 0,69 à 1,64 mg/cm², sur un modèle *in vitro* de fibroblastes humains cultivés de façon à obtenir des cultures cellulaires tridimensionnelles. Bien qu'une altération transitoire de la fonction mitochondriale ait été observée ainsi que la présence d'Ag dans les cellules (par mesure indirecte), aucune altération de la viabilité ou de la prolifération des cellules n'a été mesurée après 9 jours de contact. Les auteurs ont également obtenu des biopsies humaines après utilisation de l'Acticoat TM Flex3 pendant 17 jours. Des agrégats de nanoparticules sont retrouvés dans le cytoplasme des cellules du derme. Les nanoparticules d'argent restent relativement en surface dans les tissus cicatrisés, alors qu'elles pénètrent plus facilement dans les tissus lésés.

Dans une étude menée sur 16 patients, des pansements contenant des nanoparticules d'argent ont été appliqués sur peau saine pendant 4 à 6 jours (George, Merten *et al.* 2013). La majorité des nanoparticules d'argent restent accumulées dans le *stratum corneum* de l'épiderme. Toutefois, chez 25 % des patients, on retrouve des nanoparticules d'argent dans la partie la plus profonde du derme, le derme réticulaire, sans qu'une rétention particulière dans l'épiderme soit observée. Cependant, la concentration sanguine en Ag reste identique à celle précédant l'application du traitement. De plus, les auteurs ne mentionnent pas la surface de peau qui a été recouverte par les pansements.

À ce jour, aucune étude d'absorption cutanée *in vivo* selon la ligne directrice OCDE 427 n'a été publiée. Des études menées chez le rongeur sur peau saine ou lésée mentionnent une toxicité systémique à la suite de l'application de nanoparticules d'argent sur peau lésée, ce qui laisse à penser qu'il existe un passage cutané d'argent sous une forme indéterminée. Cependant, les études décrites plus loin dans le document (voir paragraphe 7.2.2.2 Toxicité *in vivo* aiguë et subchronique, voie cutanée et sous-cutanée) présentent des biais et des incertitudes méthodologiques empêchant de formuler une conclusion définitive. Deux études *ex vivo* ont été réalisées à partir d'explants de peau humaine (Larese, D'Agostin *et al.* 2009) ou de porc (Kermanizadeh, Pojana *et al.* 2013). Après abrasion de peau humaine, les nanoparticules d'argent (70 µg/cm² de nanoparticules enrobées de PVP) traversent plus facilement la barrière cutanée que dans le cas d'une peau saine. Les nanoparticules d'argent se retrouvent alors accumulées dans la couche cornée et les couches supérieures de l'épiderme. À l'inverse, sur peau de porc, les auteurs n'observent pas de rétention dans les différentes couches de la peau et constatent un passage de la totalité des nanoparticules d'argent déposées sur la peau en quelques heures. Il semble toutefois que ce passage d'Ag résulte d'une dissolution des nanoparticules d'argent.

Alors que la barrière cutanée est étudiée, les études de barrières du type hémato-encéphalique, intestinale, placentaire, testiculaires ne font l'objet que de rares études *in vitro* et *ex vivo*.

Une étude sur un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique suggère un passage des nanoparticules d'argent au travers de cette barrière. Les résultats sont toutefois très contestables devant les faiblesses méthodologiques évidentes de l'étude (Tang, Xiong *et al.* 2010). Sur un modèle *in vitro* mimant la barrière intestinale (cellules épithéliales Caco-2 en co-culture avec des cellules M), les auteurs expliquent le passage d'Ag au travers de la barrière grâce à la dissolution des nanoparticules d'argent plutôt qu'à leur simple passage en l'état (Bouwmeester, Poortman *et al.* 2011).

7.2.1.3 In vivo - biodistribution

Avant 2010, 6 études de biocinétique étaient disponibles. Quatre concernent une exposition par voie respiratoire, 1 par voie sous-cutanée et 1 après exposition sur peau lésée. Ces différentes

études mentionnent comme principaux organes de rétention le foie et la rate ainsi que la présence d'Ag dans le cerveau après inhalation (Ji, Jung *et al.* 2007; Sung, Ji *et al.* 2008) et dans le sang, après utilisation de pansements aux nanoparticules d'argent chez l'homme (Trop, Novak *et al.* 2006; Vlachou, Chipp *et al.* 2007) Ces études signalent également des différences de rétention d'Ag en fonction du sexe de l'animal.

Depuis la date de parution du rapport de l'Anses en 2010, 22 publications ont été identifiées et analysées. Celles-ci sont résumées dans le tableau figurant en annexe 2.

Parmi ces études,

- 10 concernent des administrations par voie intraveineuse (IV) ou intrapéritonéale (IP), dont 5 consistent en une injection unique ;
- 5 concernent des administrations par voie respiratoire, dont trois sont des administrations uniques ;
- 7 concernent des administrations par voie orale, dont 6 sont des administrations chroniques (long terme).

Toutes ces études sont menées sur des rongeurs (rats et souris) à l'exception d'une réalisée chez le lapin. La plupart des études décrivent des accumulations d'Ag dans les organes sans qu'il soit possible de distinguer la forme ionique de la forme nanoparticulaire de l'argent (analyses ICP-MS). Les résultats sont le plus souvent exprimés en masse d'Ag par masse d'organe (en général poids humide, mais parfois également en poids sec), ce qui permet une classification grossière des organes de rétention au sein d'une même étude, mais ne permet pas de comparaison des études entre elles. Les données d'excrétion fécale et urinaires sont rarement disponibles. Néanmoins, de plus en plus d'études portent sur des analyses à différents temps après l'exposition, et peuvent intégrer ainsi une composante de « récupération » post-exposition (réversibilité). Toutefois, une biocinétique complète (rétention / excrétion / bilan total) n'est réalisée qu'exceptionnellement, ce qui représente toujours, à l'heure actuelle, la principale faiblesse des études de biodistribution publiées.

Les principales conclusions des études considérées sont :

1. Des différences de rétention ont été observées entre animaux en fonction de leur genre, quelle que soit la voie d'administration. D'une façon générale, les femelles ont une rétention supérieure aux mâles, la différence principale portant sur les reins (Kim, Song *et al.* 2010; Lee, Kim *et al.* 2013; Song, Sung *et al.* 2013). Une clairance sanguine plus lente chez la femelle a été également rapportée (Lee, Kim *et al.* 2013; Xue, Zhang *et al.* 2012).
2. Les organes de rétention le plus souvent mentionnés sont le foie, la rate, les reins, les poumons. Le foie et la rate constituent les réservoirs les plus importants d'Ag dans la plupart des études. Si quel que soit l'organe les niveaux de rétention sont extrêmement variables d'une étude à une autre, c'est encore plus marquant en ce qui concerne les testicules et le cerveau. La quantité d'Ag (en g/masse d'organe) mesurée dans les testicules est, dans certaines études après administration par voie orale ou systémique, égale ou supérieure à celle mesurée dans le foie ou la rate (Kim, Song *et al.* 2010; Park, Bae *et al.* 2010; Wang, Qu *et al.* 2013).
3. Globalement, les études indiquent une clairance rapide à partir des organes. Toutefois, les données concernant les testicules et le cerveau sont contradictoires. La tendance d'une élimination lente à partir de ces organes voire une accumulation dans le cerveau même après l'arrêt de l'exposition est reportée dans la plupart des études ayant évalué ce paramètre (Dziendzikowska, Gromadzka-Ostrowska *et al.* 2012; Lee, Kim *et al.* 2013; Song, Sung *et al.* 2013; van der Zande, Vandebriel *et al.* 2012). D'autres auteurs décrivent une élimination rapide à partir du cerveau (Garza-Ocañas, Ferrer *et al.* 2010).
4. Lorsque les données fournies le permettent, un calcul approximatif a permis d'évaluer un niveau de rétention dans le cerveau toujours très inférieur à 1 % de la quantité administrée (Austin, Umbreit *et al.* 2012; Lee, Kim *et al.* 2012b) et la majorité des études suggèrent qu'il s'agirait d'Ag sous forme ionique.

5. Lorsqu'elle est évaluée, la quantité d'Ag retrouvée dans l'organisme ne représente qu'une faible proportion de la quantité administrée initiale (Austin, Umbreit *et al.* 2012; Loeschner, Hadrup *et al.* 2011; Stebounova, Adamcakova-Dodd *et al.* 2011; van der Zande, Vandebriel *et al.* 2012), même à des temps très précoces après l'administration. Ceci suggère une élimination rapide et importante de l'Ag après administration, et ce principalement après ingestion.
6. L'élimination par voie fécale est très largement majoritaire par rapport à la voie urinaire (Lee, Kim *et al.* 2012b; Loeschner, Hadrup *et al.* 2011; Park, Park *et al.* 2011) et peut représenter jusqu'à 99 % de la dose administrée après contamination par voie orale (van der Zande, Vandebriel *et al.* 2012).
7. Dans les études comparant les formes ionique et nanoparticulaire, les résultats sont contradictoires, avec une plus faible biodisponibilité de la forme nanoparticulaire (rétention plus faible et/ou excrétion plus importante, (Loeschner, Hadrup *et al.* 2011), une rétention équivalente pour les deux formes (Austin, Umbreit *et al.* 2012) ou encore une rétention plus importante pour la forme nanoparticulaire (Wang, Qu *et al.* 2013). Toutefois, le profil de distribution (organes de rétention) semble être similaire pour les deux formes (Austin, Umbreit *et al.* 2012; Loeschner, Hadrup *et al.* 2011).
8. Un effet de taille a été recherché par plusieurs équipes. Les résultats indiquent que la taille des nanoparticules d'argent influence à la fois la distribution, la rétention et la clairance de l'Ag. Deux études s'accordent sur une rétention des nanoparticules d'argent supérieure en taille (les plus grosses) après IV ou ingestion (Lankveld, Oomen *et al.* 2010; Lee, Kim *et al.* 2013) alors qu'une étude par ingestion démontre l'inverse (Park, Bae *et al.* 2010).
9. Lorsque les nanoparticules sont administrées à différentes doses, une absence de proportionnalité entre masse administrée et accumulation est généralement obtenue, et ceci varie en fonction des organes. De même, la clairance n'est pas proportionnelle à la dose. Elle peut être plus importante pour les faibles doses que pour les doses plus fortes pour certains organes ou l'inverse (Kim, Song *et al.* 2010; Lee, Kim *et al.* 2013; Song, Sung *et al.* 2013; Wang, Qu *et al.* 2013).
10. Deux études suggèrent un passage de la barrière placentaire, bien que la quantité d'Ag retrouvée dans le fœtus soit très faible (0,008 % à 0,08 % de la dose injectée, (Austin, Umbreit *et al.* 2012; Melnik, Buzulukov *et al.* 2013). Une des études décrit une rétention d'Ag préférentiellement dans le foie des embryons (Wang, Qu *et al.* 2013).
11. Une étude ayant comparé les voies intraveineuse et intrapéritonéale montre une rétention plus de 100 fois supérieure après exposition par voie intrapéritonéale (Wang, Qu *et al.* 2013). La voie d'administration intrapéritonéale ne présente toutefois qu'une pertinence limitée.
12. L'effet du revêtement (« *coating* ») n'a été recherché que dans une étude (van der Zande, Vandebriel *et al.* 2012) et s'est avéré sans influence sur la biodistribution.

7.2.2 Toxicologie générale

7.2.2.1 Toxicité *in vitro*

De nombreux articles ont été publiés sur des systèmes d'essai *in vitro* d'origine très diverse.

Il apparaît que le niveau de cytotoxicité induit par les nanoparticules d'argent dépend de nombreux facteurs. Les nouvelles informations discutées ci-après ont été générées à partir de nanoparticules d'argent très différentes en matière de taille, de présence ou non d'un revêtement, etc. D'autres paramètres influent directement sur les résultats tels que le système d'essai mis en œuvre (type cellulaire, conditions de culture, conditions de traitement, ...), le schéma de traitement (concentration, durée, ...) et le paramètre utilisé pour mesurer la toxicité

Concernant les études de toxicité *in vitro*, il existe une grande diversité de modèles cellulaires utilisés en lien soit avec l'espèce d'origine (humaine vs non humaine) soit avec l'organe d'origine (poumon, foie, rein, intestin, peau, cellules immunitaires, et même des cellules souches). Les conditions expérimentales et les types cellulaires utilisés étant très variables d'une étude à une

autre, il n'est pas possible de déterminer si un ou plusieurs types cellulaires sont particulièrement sensibles aux effets des nanoparticules d'argent. En revanche, Gaiser *et al.* (2012) ont mis en évidence que les cellules primaires étaient plus résistantes à l'activité cytotoxique des nanoparticules d'argent en comparant cette activité *in vitro* sur des hépatocytes primaires de truite et sur une lignée hépatocytaire continue C3 humaine. Cette étude corrobore l'observation déjà soulignée dans le rapport de l'Anses publié en 2010.

De même, les nouvelles publications confirment, sur le plan qualitatif, les effets observés des nanoparticules d'argent et les hypothèses émises dans le rapport de l'Anses de 2010 :

- le blocage de la prolifération cellulaire (Eom and Choi 2010) ;
- un stress oxydant (Beer, Foldbjerg *et al.* 2012; Eom and Choi 2010; Foldbjerg, Dang *et al.* 2011; Kawata, Osawa *et al.* 2009) ;
- l'apoptose cellulaire ;(Beer, Foldbjerg *et al.* 2012; Eom and Choi 2010; Foldbjerg, Dang *et al.* 2011; Ghosh, J *et al.* 2012) et la nécrose cellulaire (Beer, Foldbjerg *et al.* 2012; Ghosh, J *et al.* 2012) ;
- la libération de médiateurs de l'inflammation décrite dans certaines études (Hackenberg, Scherzed *et al.* 2011; Samberg, Oldenburg *et al.* 2010) ;
- le mécanisme d'action toxique semble, selon certains auteurs, exclusivement de nature oxydante (Kawata, Osawa *et al.* 2009).

Aucune différence entre les niveaux de cytotoxicité de suspensions de nanoparticules d'argent et les surnageants de ces suspensions de nanoparticules d'argent (donc exclusivement des ions Ag^+) n'ont été rapportées dans d'autres publications. Ces observations suggèrent que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) susceptibles d'être impliquées dans le stress oxydant est principalement due à la présence d'ions Ag^+ , confirmant ainsi leur rôle majeur dans la toxicité des suspensions de nanoparticules d'argent (Beer, Foldbjerg *et al.* 2012).

En règle générale, l'ensemble de ces effets apparaît à des niveaux de concentrations relativement élevés (jusqu'à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour Ghosh *et al.* 2012) et pour des temps de traitement longs (> 24 heures en continu). Ainsi, il apparaît prématuré d'extrapoler ces observations aux expérimentations *in vivo* car les niveaux d'exposition élevés sont peu réalistes. Toutefois, selon certaines études, l'activité cytotoxique des nanoparticules d'argent survient à des concentrations beaucoup plus élevées que les niveaux connus pour être efficaces pour des effets antimicrobiens (Hackenberg, Scherzed *et al.* 2011; Kawata, Osawa *et al.* 2009).

Selon l'étude de Pratsinis *et al.* (2013), la toxicité dépend de la taille des nanoparticules d'argent. En effet, les auteurs constatent que la viabilité de macrophages de souris en présence de nanoparticules d'argent de petite taille (< 10 nm) est toujours inférieure à celle des échantillons contenant des nanoparticules d'argent de plus grande taille (> 10 nm). Cette différence de viabilité peut s'expliquer en grande partie par l'augmentation de la quantité d'ions Ag^+ en solution libérés lors de la dissolution des nanoparticules d'argent de taille inférieure à 10 nm et, dans une moindre mesure, la petite taille de ces nanoparticules d'argent favorise les interactions cellulaires directes avec la surface des nanoparticules. Inversement, dans le cas des nanoparticules d'argent de plus grande taille, leur cytotoxicité est attribuée en grande partie à des interactions cellulaires avec les nanoparticules d'argent plutôt qu'aux ions Ag^+ libérés. Il résulte que pour induire une cytotoxicité de même magnitude, la concentration massique en nanoparticules d'argent de plus petite taille est moindre. Il est à noter que pour certains auteurs, les effets cytotoxiques sont observés plus largement avec des nanoparticules d'argent comparativement aux ions Ag^+ (Eom and Choi 2010).

Enfin, comme indiqué préalablement, la présence d'un revêtement de surface influe sur le niveau de cytotoxicité et peut avoir soit un effet protecteur vis-à-vis de la libération des ions Ag^+ , soit un effet spécifique faisant appel à un mécanisme d'action spécifique à la taille nanométrique.

7.2.2.2 Toxicité *in vivo*

Un tableau présenté en annexe 2 résume le détail des résultats des publications prises en compte dans cette partie. Il est à remarquer qu'aucune publication scientifique d'études de toxicité chronique (long terme) n'est disponible ou n'a été retenue par le GT pour cette partie. De manière

générale, il faut noter que les effets rapportés ne suivent pas souvent une courbe dose réponse. De plus, il existe une grande diversité d'une étude à l'autre sur les doses utilisées mais également sur les périodes d'observation après les administrations et peut, en plus des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent, expliquer la variabilité des réponses observées dans les études.

Par voie orale

Selon les résultats de toxicité aiguë, les rongeurs semblent supporter une forte dose de nanoparticules d'argent administrée par gavage (jusqu'à au moins 1 000 à 5 000 mg/kg) (Kim, Song *et al.* 2013; Maneewattanapinyo, Banlunara *et al.* 2011; Philbrook, Winn *et al.* 2011). Même si le nombre d'études reste faible, aucun effet sur la mortalité, sur la prise de poids, sur les paramètres hématologiques ni sur l'observation macroscopique et histologique des principaux organes systémiques n'a été relevé.

Les données de toxicité sub-chronique (de 28 jours à 13 semaines) apparaissent plus contradictoires. Si certains auteurs ne détectent pas d'altérations sur le poids corporel, la prise de nourriture, le poids de différents organes et les paramètres hématologiques et biochimiques au niveau sanguin (Hadrup, Lam *et al.* 2012; Hong, Kim *et al.* 2014; van der Zande, Vandebriel *et al.* 2012), d'autres observent :

- des diminutions de poids corporel (Ebabe Elle, Gaillet *et al.* 2013; Kim, Song *et al.* 2010; Shahare and Yashpal 2013) et du poids de certains organes comme les testicules chez le mâle ou encore les reins chez les femelles (Kim, Song *et al.* 2010) ;
- des augmentations de certains paramètres biochimiques au niveau sanguin comme le cholestérol et les enzymes hépatiques Alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (AST) (Ebabe Elle, Gaillet *et al.* 2013; Lee, Kim *et al.* 2013) ;
- des altérations histologiques comme de l'alopécie (Hong, Kim *et al.* 2014), des gouttelettes lipidiques au niveau du foie ainsi que des régénérations tubulaires au niveau des reins (Lee, Kim *et al.* 2013), une augmentation du nombre des cellules à mucus et du mucus produit par l'intestin ainsi qu'une accumulation d'Ag dans la *lamina propria* et la lame basale de l'intestin (Jeong, Jo *et al.* 2010) (Jeong *et al.* 2010) ou encore la destruction des villosités intestinales (Shahare and Yashpal 2013) ;
- du stress oxydant dans le foie et le cœur (Ebabe Elle, Gaillet *et al.* 2013) ;
- des marqueurs d'inflammation dans le foie (Ebabe Elle, Gaillet *et al.* 2013; Lee, Kim *et al.* 2013) et l'augmentation de cellules inflammatoires dans la *lamina propria* de l'intestin (Shahare and Yashpal 2013) ;
- l'augmentation urinaire de l'acide urique et de l'allantoïne chez les femelles traitées (Hadrup, Lam *et al.* 2012).

Des essais chez les poulets ont également été réalisés en administrant des nanoparticules d'argent soit dans l'eau de boisson soit dans l'alimentation (Ahmadi 2012; Ahmadi and Rahimi 2011). Des effets sur la mortalité et sur la prise de poids ont été observés. De plus, les résultats suggèrent que l'Ag s'accumule non seulement dans des organes déjà identifiés dans les études chez les mammifères (foie, reins) (Ahmadi 2012; Ahmadi and Rahimi 2011; Chauhe and Siebrits 2012) mais aussi dans les muscles (Ahmadi 2012; Ahmadi and Rahimi 2011). Toutefois, ces études présentent des lacunes tant au niveau de la méthodologie employée que de la description des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules qui ne permettent pas de les interpréter de façon fiable. Néanmoins, de telles études soulèvent la problématique de l'utilisation de nanoparticules d'argent dans l'alimentation animale et du risque potentiel d'exposition humaine lors de la consommation de ces animaux en cas d'imprégnation par les nanoparticules (résidus).

Par voie pulmonaire

Concernant la toxicité aiguë, aucune cytotoxicité ni altération de la barrière alvéolo-capillaire n'ont été observées 1 ou 7 jours après l'exposition chez des rats mâles traités par voie pulmonaire avec un générateur d'aérosols (Roberts, McKinney *et al.* 2013). D'autres études rapportent une

augmentation d'un ou de plusieurs marqueurs au niveau du liquide broncho-alvéolaire (LBA) (activité LDH, nombre total de cellules, nombre de neutrophiles, contenu en protéines et en cytokines) (Haberl, Hirn *et al.* 2013; Kwon, Minai-Tehrani *et al.* 2012; Roberts, McKinney *et al.* 2013; Wang, Qu *et al.* 2013). Si ces études par inhalation ne rapportent pas d'effet histologique dans les poumons, Wang *et al.* (2014) observent des zones d'inflammation 40 h après l'administration intra-trachéale de nanoparticules d'argents. Ces effets sont plus prononcés pour les nanoparticules d'argent de taille inférieure (20 nm). Cependant, 21 jours après l'administration, des effets persistants ont été notés avec des nanoparticules d'argent de 110 nm (augmentation du contenu en collagène total des poumons, fibrose précoce et augmentation de facteurs de croissance dans le LBA, mais uniquement à la plus forte dose (1 mg/kg). De même, l'instillation intra-trachéale de nanoparticules d'argent chez le rat femelle a provoqué une cytotoxicité et une inflammation au niveau pulmonaire à la dose forte de 250 µg par animal, mais aucun effet à la dose minimale de 50 µg par animal (Haberl, Hirn *et al.* 2013). L'ensemble des études signale l'accumulation d'argent sous une forme indéterminée dans les poumons, et Halberl *et al.* (2013) ont montré l'internalisation des nanoparticules d'argent dans les macrophages alvéolaires.

Une seule étude avec des nanofils d'argent (*nanowires*) est disponible. Elle montre une nette influence de la taille sur les effets induits au niveau du LBA et des poumons. Ainsi, les nanofils d'argent les plus longs (14 µm) génèrent une augmentation beaucoup plus marquée des granulomes et des infiltrats de lymphocytes au niveau du tissu pulmonaire. L'incorporation des nanofils d'argent dans les macrophages alvéolaires par phagocytose a également été observée (Schinwald, Chernova *et al.* 2012).

De même, une seule étude proposant une administration intra-nasale a été répertoriée avec des nanoparticules d'argent de 25 nm (Genter, Newman *et al.* 2012). Elle ne montre aucun effet macroscopique et histologique sur les organes comme le foie, le cerveau, les poumons et les reins. Par contre, des érosions de l'épithélium nasal sont relevées. Cependant, il faut noter que les doses administrées (100 et 500 mg/kg à des souris) sont très élevées et plutôt représentatives d'une exposition humaine.

Pour la toxicité sub-chronique, seulement deux études ont été réalisées en chambre d'inhalation, l'une de ces études servant à 4 publications. Stebounova *et al.* (Stebounova, Adamcakova-Dodd *et al.* 2011) montrent par examen histologique que l'inhalation en chambre de nanoparticules d'argent de 10 nm (3,3 mg/m³, 4 h / j, 5 j / semaine) pendant 2 semaines ne provoque pas d'inflammation au niveau du poumon, même si des marqueurs d'inflammation (augmentation du nombre total de cellules et du nombre de neutrophiles) sont observés dans le LBA. En revanche, l'étude de Sung *et al.* (2009) indique que l'inhalation en chambre de nanoparticules d'argent (jusqu'à 3 x 10⁶ particules / cm³, 5 j / semaine, 6 h / j) pendant 12 à 13 semaines provoque des inflammations alvéolaires dans les poumons avec l'accumulation de macrophages. Suite à une période de récupération de 12 semaines, l'inflammation diminue mais elle reste persistante chez les mâles exposés à la plus forte dose (Song, Sung *et al.* 2013). Les paramètres respiratoires sont altérés chez les mâles mais pas chez les femelles (Song, Sung *et al.* 2013). De plus, une hypertrophie des canaux biliaires est observée à la plus forte dose sans qu'aucun effet sur les reins ni sur le cœur ne soit signalé (Sung, Ji *et al.* 2009). Une accumulation dose dépendante d'Ag est observée dans tous les organes testés (poumons, sang, rate, foie, reins) et la période de récupération de 12 semaines ne suffit pas à éliminer complètement l'Ag accumulé dans les poumons, le foie et la rate (Song, Sung *et al.* 2013). Même si une accumulation d'Ag est plus marquée chez les femelles que chez les mâles, la fonction rénale ne semble pas affectée, excepté pour les mâles à la plus forte dose (Sung, Ji *et al.* 2009). En effet, les gènes impliqués dans le système redox, l'inflammation, le cycle cellulaire et l'apoptose ne sont pas altérés dans les reins, ce qui explique que les effets toxiques soient peu sévères (Dong, Choi *et al.* 2013). Les auteurs suggèrent que l'argent accumulé dans les reins pourrait être complexé par des thiols. La différence de comportement de l'Ag entre mâles et femelles pourrait être due à des transporteurs ou des protéines de liaison ainsi qu'à une structure tissulaire différente entre mâles et femelles (Dong, Choi *et al.* 2013). L'étude de Stebounova *et al.* (2011) montre également une accumulation d'Ag dans les poumons et le LBA, avec une internalisation dans les phagosomes des macrophages, mais les niveaux dans le cœur, le foie et les reins restent inférieurs à la limite de détection. Cette

différence entre les deux études pourrait s'expliquer par un temps de traitement plus court dans l'étude de Stebounova et al (2011).

L'instillation intra-trachéale de nanoparticules d'argent à raison de 3,5 et 17,5 mg/kg (52 nm en moyenne), tous les 2 jours pendant 5 semaines provoque dans le LBA des rats exposés :

- du stress oxydant (diminution des niveaux d'antioxydants (SOD et GSH) et augmentation des niveaux d'oxyde nitrique (NO) et de malondialdéhyde (MDA) de façon dose dépendante ;
- de l'inflammation (augmentation des niveaux d'IL6 et de TNF- α , seulement à la plus forte dose pour TNF) (Liu, Yang *et al.* 2013).

Par voie cutanée et sous-cutanée

Les études s'attachant aux effets par voie cutanée restent encore peu nombreuses.

Aucun effet de toxicité aiguë n'a été détecté chez le rat après administration de 2 000 mg / kg pendant 24 h sur un pansement contenant des nanoparticules d'argent de 10 nm (Kim, Song *et al.* 2013). Il en est de même chez le lapin où aucune formation d'œdème, d'érythème et d'escarre n'a été observée entre 1 et 3 jours après le traitement (Han, Woo *et al.* 2012). Sur le cobaye, l'administration de ces nanoparticules d'argent provoque un taux de sensibilité cutanée de 5 % (1 animal sur 20 présentant un faible érythème) ; ces nanoparticules d'argent sont donc classées dans la catégorie I des sensibilisants (Kim, Song *et al.* 2013). Korani *et al.* (Korani, Rezayat *et al.* 2013) observent une réduction de l'épiderme et de la couche papillaire ainsi que des signes d'inflammation suite à une simple administration de 100 et 1 000 mg/kg de nanoparticules d'argent sur la peau de cobayes. Hormis l'inflammation, ces effets sont plus importants avec la plus forte dose.

Pour des administrations cutanées sub-chroniques, seulement 1 publication a été identifiée chez le porc, réputé être un bon modèle animal pour prédire la pénétration cutanée chez l'homme. Cette étude rapporte les effets de nanoparticules d'argent de 20 nm sur la peau de porcs traités pendant 14 jours avec des solutions entre 0,34 et 34 μ g/ml. Leurs résultats indiquent que, si, par observation macroscopique, aucun œdème ni érythème n'est visible (test de Draize), par observation microscopique, des réponses dose-dépendantes d'œdème épidermique et d'inflammation dermique sont obtenues (Samberg, Oldenburg *et al.* 2010). Comme précédemment publié par Larese *et al.* (2009), des nanoparticules d'argent ne sont détectées que dans les couches superficielles de la peau, au niveau du *stratum corneum*. Deux autres publications sont également parues pour visualiser les effets de nanoparticules d'argent sur des peaux lésées de rongeurs. Même si elles ont le mérite d'exister, elles ne sont pas très explicites et leurs résultats sont donc à prendre avec précaution. Aucune mortalité n'est observée après l'administration pendant 21 jours de nanoparticules d'argent dans des pansements sur des peaux brûlées de rats mâles (relargage en moyenne de 0,6 μ g/ml d'Ag pendant 24 h). De même, aucun effet sur le poids des rats ni sur les paramètres hématologiques à la fin du traitement n'est observé. Par contre, une augmentation des poids du foie et des reins ainsi que du taux d'enzymes ALT sériques est rapportée (Bidgoli, Mahdavi *et al.* 2013). De même, l'administration réitérée à 100, 1 000 et 10 000 μ g/ml, 5 j / semaine, pendant 13 semaines chez les cobayes montre des effets histologiques dose-dépendants sur la peau (réduction de l'épiderme, du derme et de la couche papillaire, signes d'inflammation), sur le foie (nécrose, augmentation des cellules de Kuppfer) et sur la rate (inflammation de la pulpe rouge, atrophie de la pulpe blanche) (Korani, Rezayat *et al.* 2013). Enfin, après l'application de pansements contenant des nanoparticules d'argent de 30 nm (50 μ l d'une solution à 10 μ g/ml) 1 fois / j pendant 2 semaines sur une blessure cutanée générée sur la peau de souris, des lésions au niveau du foie (altération de l'arrangement radial des hépatocytes, augmentation du nombre des cellules de Kuppfer et inflammatoires, ...) sont observées (Heydarnejad, Yarmohammadi-Samani *et al.* 2014). Aucune altération cutanée n'a été observée après administration intradermique chez le lapin à 1,97 μ g/ml (Han, Woo *et al.* 2012).

Des études peuvent être retrouvées dans le domaine de la médecine avec l'utilisation de pansements contenant des nanoparticules d'argent. Cependant, elles prennent généralement en

compte le coté bénéfique cicatrisant et anti infectieux des nanoparticules d'argent et les effets nocifs potentiels ne sont pas toujours rapportés.

L'une de ces études s'attache à évaluer l'effet d'un traitement pendant 7 jours avec un pansement Acticoat sur des biopsies de peau de patients brûlés. À la fin du traitement, dans la partie cicatrisée, même si les nanoparticules d'argent ne sont plus observées dans l'épiderme, elles sont présentes en grand nombre sous forme d'agglomérats au niveau de la partie supérieure du derme, dans la matrice extracellulaire autour des fibroblastes. Dans le cytoplasme, elles sont localisées proche des mitochondries (Rigo, Ferroni *et al.* 2013). Dans la partie basse du derme, des agglomérats proches de la membrane nucléaire sont observés dans les fibroblastes. Il est à noter qu'aucun des 98 patients traités avec Acticoat entre janvier 2011 et septembre 2012 n'a montré de signe d'argyrie ni de coloration de la peau due à l'accumulation d'Ag.

Par voie oculaire

Deux études d'irritation oculaire chez le lapin (100 mg de la substance testée appliquée dans l'un des yeux) présentent des résultats qui diffèrent : la première n'a montré aucun effet, alors que la seconde rapporte l'apparition de conjonctivite et d'œdème 1 h après l'élimination des nanoparticules d'argent. Néanmoins, aucune atteinte de la cornée, de l'iris et de la conjonctive n'a été notée à des temps d'observation de 24, 48 et 72 h après retrait (Kim, Song *et al.* 2013). Une autre étude montre que certains cobayes ayant reçu une administration de 5 000 ppm au niveau oculaire ont développé une irritation de la conjonctive (niveau 1) dès 1 h et jusqu'à 24 h, qui disparaît à 48 h (Maneewattanapinyo, Banlunara *et al.* 2011).

Par voies intrapéritonéale et intraveineuse

Pour la toxicité aiguë, Xue *et al.* (2012) rapportent une mortalité en 30 h après injection intraveineuse (IV) d'une dose de nanoparticules d'argent de 200 mg/kg chez la souris, générant des œdèmes au niveau des poumons et du foie. Par injection intrapéritonéale (IP), chez le rat, une dose de 500 mg/kg ne provoque aucune mortalité, alors qu'une dose de 1 000 mg/kg provoque 20 % de mortalité 30 jours après l'injection (Lee, Liu *et al.* 2013).

À la lecture des différentes publications (*cf.* tableau en annexe), il ressort que :

- après l'administration de fortes doses, 120 mg/kg chez la souris en IV (Xue, Zhang *et al.* 2012) et 500 à 1 000 mg/kg chez le rat en IP (Lee, Liu *et al.* 2013), des altérations histologiques au niveau du foie et du poumon sont observées. De plus, dans cette étude, des foyers de dégénérescence et d'inflammation sont détectés avec une augmentation du phénomène jusqu'à 1 mois après l'administration ;
- avec des doses plus faibles (de 1 à 40 mg/kg), des marqueurs d'inflammation (IL10, TNF- α) (Kermanizadeh, Chauché *et al.* 2013) ou de stress oxydant (Tiwari, Jin *et al.* 2011) dans le foie, d'altération hépatique au niveau sérique (Tiwari, Jin *et al.* 2011) ainsi qu'une augmentation de l'indice gonadosomatique (Gromadzka-Ostrowska, Dziendzikowska *et al.* 2012) ont été détectés.

Pour la toxicité sub-chronique, une étude après 28 jours d'administration IV (1 fois par jour) de nanoparticules d'argent de 20 et 100 nm, jusqu'à 6 mg/kg à des rats montre que seule une perte de poids chez les animaux des deux sexes est observée avec la plus forte dose (6 mg/kg). Cet effet est aussi observé pour des doses plus faibles (0,67 et 0,025 mg/kg) chez les mâles, et uniquement avec la particule de 20 nm (De Jong, Van Der Ven *et al.* 2013). En plus d'une forte augmentation des poids du foie, du thymus et de la rate, l'examen macroscopique à la fin du traitement indique un élargissement et une coloration brune de la rate et du foie, de même que des nodules lymphatiques à la plus forte dose. L'examen histologique révèle une pigmentation dans plusieurs organes y compris le foie (dans les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales veineuses et les cellules inflammatoires), la rate (dans la pulpe rouge pour les nanoparticules d'argent de 20 nm et dans les pulpes blanche et rouge pour les nanoparticules d'argent de 100 nm), les nœuds lymphatiques mais aussi le rein, les glandes surrénales et tout le long du tractus digestif.

Le traitement IV de souris pendant 3 jours de gestation (J7 à 9) ne montre pas d'altération du cerveau, du cœur, des reins, du foie, des poumons, de la rate, de l'endomètre et du placenta (Austin, Umbreit *et al.* 2012).

Cancérogenèse

Aucun essai de cancérogenèse standard n'a été réalisé sur des nanoparticules d'argent.

En revanche, plusieurs études visant à démontrer leur potentiel anti-angiogène ou anti-tumoral ont été menées. Elles montrent que le traitement avec les nanoparticules d'argent provoque :

- *in vitro*, une diminution de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) (Gurunathan, Lee *et al.* 2009) ;
- *in vivo*, une réduction de la progression tumorale et de la production d'ascite⁵¹ (65 %) avec une augmentation de la survie des souris avec des tumeurs induites. (Sriram, Kanth *et al.* 2010).

Un effet protecteur des nanoparticules d'argent contre l'hépatotoxicité induite par le tétrachlorométhane (CCl₄) a été observé à la plus faible dose de nanoparticules d'argent testées (25 mg/kg, traitement par voie orale entre 3 et 10 jours après injection IP de CCl₄) tandis que les deux doses plus fortes (50 et 100 mg/kg) ne présentent pas cet effet (Suriyakalaa, Antony *et al.* 2013).

7.2.2.3 Discussion sur la toxicité *in vitro* et *in vivo*

Dans le rapport de l'Anses « *Nanomatériaux et produits de consommation* » de mars 2010, il avait été mentionné que les mécanismes d'action toxique semblaient principalement liés au déséquilibre de la balance oxydation/réduction. Il était en effet clairement apparu que les nanoparticules d'argent induisaient un stress oxydant *in vitro* qui contribuait à la survenue de modifications morphologiques cellulaires et au dysfonctionnement mitochondrial. De plus, les nanoparticules d'argent participaient à l'augmentation de la génération d'ERO d'une façon dose-dépendante et ce, quelle que soit leur taille. Il a été mis en évidence que l'induction d'ERO était favorisée par la diminution de la taille des nanoparticules. L'arrêt du cycle cellulaire et l'observation de phénomènes apoptotiques (à des concentrations faibles) et/ou nécrotiques (à des concentrations plus élevées) attribuables à la production d'ERO avaient également été constatés. Par ailleurs, la cytotoxicité *in vitro* avait été évaluée sur plusieurs modèles cellulaires (de diverses origines) et les cellules primaires semblaient offrir une plus forte « résistance » au traitement par des nanoparticules d'argent comparativement aux lignées continues.

Depuis, de nouvelles études ont été publiées sur de nombreux systèmes d'essai *in vitro* et *in vivo*. Elles confirment les observations et hypothèses mécanistiques émises dans le rapport de l'Anses publié en 2010 mais apportent également des éléments nouveaux, décrits ci-après. Les évaluations de la toxicité *in vivo* sont également plus nombreuses.

Phénomènes toxiques, paramètres impliqués et mécanismes d'action toxique possibles

Les résultats obtenus *in vitro* indiquent que la mort cellulaire est principalement due à une augmentation dose-dépendante de nécrose et d'apoptose tardive (Foldbjerg, Dang *et al.* 2011) et confirment que la cytotoxicité des nanoparticules d'argent dépend fortement de la concentration en ions Ag⁺ qui serait l'origine principale de la production d'ERO (Beer, Foldbjerg *et al.* 2012). Un mécanisme d'action toxique exclusivement de nature oxydante avec apparition d'ERO a été proposé (Kawata, Osawa *et al.* 2009).

Les connaissances actuelles suggèrent que les propriétés de surface sont impliquées dans la toxicité des nanoparticules d'argent, incluant également les modifications de surface apparaissant au cours de transformations biologiques, dans l'organisme ou l'environnement (Liu, Wang *et al.* 2012), Prasad *et al.* 2013). En effet, le milieu de culture cellulaire peut directement impacter le niveau de cytotoxicité des nanoparticules d'argent selon sa composition et surtout la présence et la

⁵¹ Épanchement liquidien intra-abdominal

quantité de protéines (Kermanizadeh, Vranic *et al.* 2013). Toutefois, les résultats obtenus après l'exposition de cellules à des nanoparticules d'argent enrobées sont contradictoires. Certaines études indiquent que le stress oxydant n'est pas le mécanisme primaire de toxicité de ce type de nanoparticules d'argent (Nguyen, Seligy *et al.* 2013), car l'augmentation de la formation d'ERO contribuant à des changements significatifs en GSH et SOD n'est pas mis en évidence. En revanche, d'autres auteurs rapportent l'induction d'un déséquilibre de la balance oxydation/réduction avec des nanoparticules d'argent enrobées par du PVP ou des citrates (Prasad, McGee *et al.* 2013; Wang, Ji *et al.* 2014b) et formulent l'hypothèse que ces revêtements pourraient complexer les éventuels ions Ag^+ (Wang, Ji *et al.* 2014b).

L'importance de l'effet de la dissolution des nanoparticules d'argent sur la toxicité de ces dernières n'est toujours pas clairement établie, bien que cette question soit de plus en plus étudiée. En amont de la question de la toxicité particulière des nanoparticules d'argent par rapport aux ions Ag^+ , il conviendrait de déterminer si la biodistribution ainsi que les voies d'excrétion et d'élimination des nanoparticules d'argent diffèrent de celle des ions Ag^+ . Pour certains auteurs, la cytotoxicité des nanoparticules d'argent est bien plus importante que celle des ions Ag^+ (Eom and Choi 2010; Kawata, Osawa *et al.* 2009). Pour d'autres, les nanoparticules d'argent de très petite taille (< 10 nm) induiraient une toxicité *via* les ions Ag^+ libérés par dissolution, tandis que pour des tailles plus grandes, la cytotoxicité des nanoparticules d'argent s'expliquerait par leurs interactions avec des composants cellulaires. Un effet combiné entre les nanoparticules d'argent et les ions Ag^+ existerait pour les plus faibles concentrations en Ag^+ (Beer, Foldbjerg *et al.* 2012). Enfin, d'autres publications démontrent que les niveaux de cytotoxicité entre nanoparticules d'argent et Ag^+ sont similaires (Beer, Foldbjerg *et al.* 2012; Foldbjerg, Dang *et al.* 2011).

Il est à noter que la diminution dose-dépendante de la viabilité cellulaire peut également être accompagnée d'une augmentation significative de médiateurs de l'inflammation (Kermanizadeh, Chauché *et al.* 2013; Samberg, Oldenburg *et al.* 2010). De même, des nanoparticules d'argent nues peuvent induire des changements significatifs en anti-oxydants GSH et SOD, tandis que des nanoparticules d'argent enrobées provoquent des dommages cellulaires par induction d'inflammation en sur-régulant certaines cytokines (Nguyen, Seligy *et al.* 2013). Chronologiquement, les étapes couramment décrites relatives à la survenue de cytotoxicité se déroulent tout d'abord par les réactions de défense antioxydante, puis, dans le cas de dépassement de cette capacité de prise en charge d'espèces radicalaires, par l'induction d'inflammation (avec comme réponse cellulaire la libération de cytokines et chimiokines) et enfin, par l'apparition de phénomènes cytotoxiques tels que nécrose et apoptose (Baeza A & Marano F, 2007).

Comparaison - extrapolation *in vitro* / *in vivo*

Les données de la littérature scientifique ne permettent pas de faire actuellement une comparaison des résultats des tests *in vitro* et *in vivo*. De même, la comparaison des études *in vitro* entre elles ou *in vivo* entre elles reste très difficile. Cela s'explique principalement par une connaissance lacunaire concernant les caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux dans le milieu d'exposition ou dans les tissus exposés, les conditions d'exposition elles-mêmes, ou l'inhomogénéité des métriques utilisées. Par exemple, les traitements effectués par voie pulmonaire sont difficiles à comparer car les systèmes d'exposition peuvent être très différents (instillation oro-pharyngée, générateur d'aérosols système « *nose-only* » ou corps entier). Cependant, la pertinence, la praticité (instillation oro-pharyngée par exemple) ou l'intérêt de certaines méthodes reste à démontrer vis-à-vis d'expositions réalistes chez l'homme.

Concernant les études *in vitro*, les modèles cellulaires sont extrêmement diversifiés tant au niveau de l'espèce d'origine (humaine vs non humaine) qu'au niveau de l'organe d'origine (cellules immunitaires, pulmonaires, hépatiques, rénales, intestinales, cutanées et même des cellules souches). L'utilisation de cellules spécifiques ou représentatives d'un organe cible dans des systèmes *in vitro* pourrait se révéler particulièrement utile lors de la recherche des effets et/ou des mécanismes d'action toxiques sur cet organe. De même, il serait ainsi possible de disposer de modèles qui soient d'une part prédictifs d'une toxicité organo-spécifique et d'autre part extrapolables à l'organisme entier.

D'après les données de biodistribution *in vivo* (cf. paragraphe 7.2.1.3), les organes de rétention le plus souvent mentionnés pour l'argent sont, par ordre d'importance : le foie, la rate, les reins et les poumons. Bien qu'aucune donnée sur des cellules de la rate (splénocytes) ne soit disponible, il existe en revanche des données de cytotoxicité concernant des cellules de foie, de rein et de poumon. Les études correspondantes utilisent souvent des temps de traitement longs (expositions chroniques) et conduisent à des concentrations létales (CI50) de l'ordre du µg/ml. Il est à noter que les traitements aigus ou sub-chroniques n'ont globalement entraîné que peu de signes cliniques significatifs et/ou durables ni même d'effets sur le comportement quelle que soit la voie de traitement utilisée. En revanche, quelques effets mineurs sont rapportés au niveau des organes primo-exposés (poumons, intestin) ou des organes systémiques (foie, rate et reins essentiellement). Cependant, les résultats de ces essais restent difficiles à interpréter en particulier du fait de l'absence de réponse dose-dépendante. Ainsi, la prédictivité des expérimentations *in vitro* n'est pas clairement établie lorsque des doses importantes ou des temps de traitement longs sont utilisés, car ils mènent à l'observation d'effets qui ne sont peut-être pas spécifiques.

De plus, et comme souligné dans le rapport de l'Anses publié en 2010, les cellules offrent une meilleure viabilité (résistance) en présence de nanoparticules d'argent lorsqu'elles proviennent de culture primaire comparativement aux lignées continues (Arora, Jain *et al.* 2009).

Une difficulté supplémentaire pour comparer ou extrapoler les résultats d'études *in vitro* et *in vivo* réside dans les différentes unités de mesure utilisées pour caractériser les expositions. En effet, les expositions *in vitro* sont la plupart du temps exprimées en µM, µg/ml ou µg/cm², sans que le nombre de cellules, le nombre de particules ou la surface d'exposition soient précisés. Or, il a été mentionné par Holder *et al.* (Holder and Marr 2013) qu'une expression en µg/ml ou en µg/cm² peut modifier les valeurs toxicologiques. *In vivo*, les expositions par inhalation sont données en nombre de particules / m³ ou en µg/m³. Les données des autres types d'exposition sont généralement exprimées en mg/kg. Les concentrations dans les tissus de dépôt ne sont généralement pas évaluées, rendant difficiles les interprétations.

7.2.3 Génotoxicité

Dans le rapport de l'Anses de mars 2010, les données existantes montraient que les nanoparticules d'argent induisaient *in vitro* des lésions de l'ADN dose-dépendantes, aussi bien avec le test des comètes que celui du micronoyau, sur diverses cellules cependant peu représentatives d'une exposition humaine. L'implication des ERO, provenant à la fois des ions Ag⁺ et de l'état nanoparticulaire, dans la génotoxicité des nanoparticules d'argent apparaissait comme étant probable.

Depuis ce rapport, de nombreuses publications utilisant divers systèmes d'essai *in vitro* et *in vivo* confirment l'ensemble de ces constatations et de ces hypothèses. En effet, les nanoparticules d'argent sont capables d'induire des altérations primaires de l'ADN, des mutations géniques et chromosomiques en particulier *in vitro*, même si des effets contradictoires sont parfois constatés.

7.2.3.1 Génotoxicité *in vitro*

Concernant les études *in vitro*, il existe une grande diversité de modèles cellulaires utilisés tant au niveau de l'espèce d'origine (humaine vs non humaine) qu'au niveau de l'organe d'origine (poumon, foie, rein, cellules lymphoblastoïdes...).

Concernant les altérations primaires de l'ADN *in vitro* :

À ce jour, il n'existe pas de ligne directrice permettant d'harmoniser le protocole d'étude utilisant le test des comètes *in vitro*. Cependant, des groupes d'experts recommandent d'utiliser un temps d'exposition des cellules court, de l'ordre de 3 à 6 h (Hartmann, Plappert *et al.* 2003; Tice, Agurell *et al.* 2000). Un temps court semble suffisant pour faire la démonstration d'induction d'altérations primaires de l'ADN qui ne sont pas cumulables. De plus, un temps d'exposition court évite la génération d'effets non spécifiques qui surviennent en général après un temps long, avec des doses importantes de suspensions de nanoparticules qui se trouvent directement en contact avec les cultures de cellules.

Le test des comètes⁵² s'est révélé positif dans deux études effectuées sur des cellules bronchiques humaines de type Beas-2B (Kim, Kim *et al.* 2011; Nymark, Catalán *et al.* 2013). Ces deux études donnent des résultats qualitativement identiques bien que les nanoparticules d'argent utilisées soient différentes : particules primaires de 43 nm sans précision quant à la présence d'un revêtement pour Kim *et al.* (2011) et particules primaires de $42,5 \pm 14,5$ nm avec un revêtement en PVP pour Nymark *et al.* (2013). De plus, le niveau de lésions de l'ADN s'est avéré plus important en modifiant le protocole standard du test des comètes par l'ajout d'enzymes de réparation de bases oxydées de l'ADN. Ce résultat confirme la génération d'ERO cellulaires libres et leur implication dans la réponse génotoxique. Le même constat est fait par Flower *et al.* (Flower, Brabu *et al.* 2012) et par Ghosh *et al.* (Ghosh, J *et al.* 2012) qui ont réalisé le test des comètes *in vitro* sur des lymphocytes humains et par Kermanizadeh *et al.* (Kermanizadeh, Vranic *et al.* 2013) qui ont démontré l'induction de fragmentation de l'ADN *in vitro* sur des cellules épithéliales rénales humaines immortalisées HK-2 exposées pendant 4 heures. Des concentrations sub-létales. (Foldbjerg, Dang *et al.* 2011) ont également montré une augmentation dose-dépendante et significative du nombre d'adduits à l'ADN après traitement de cellules alvéolaires humaines A549 pendant 24 heures avec des nanoparticules d'argent (particules primaires 30-50 nm). En outre, cet effet est inhibé en présence d'un antioxydant (N-acétyl cystéine, NAC). Ainsi, l'ensemble de ces résultats tend à confirmer un mécanisme d'action génotoxique concernant les altérations primaires de l'ADN *in vitro* via des mécanismes d'oxydation.

Toutefois, les résultats obtenus sur des lignées primaires ou continues d'origine murine indiquent l'absence d'augmentation significative de la fragmentation de l'ADN. En effet, le test des comètes est négatif sur des cellules de fibroblastes de souris L929 traitées pendant 72 heures avec des nanoparticules d'argent de taille moyenne de $11,3 \pm 2,3$ nm (Nallathamby and Xu 2010). De même, un résultat négatif est obtenu sur des cellules testiculaires primaires de souris C57Bl6 sauvages (WT) et transgéniques (KO mOGG1^{-/-}) suite à des traitements pendant 24 à 72 heures (Asare, Instanes *et al.* 2012). En revanche, dans cette dernière étude, le maximum de fragmentation de l'ADN a été obtenu avec les nanoparticules d'argent de 200 nm sur la lignée continue NT2 d'origine humaine. D'après les auteurs, cette différence de réponse pourrait être liée au fait que les cellules testiculaires humaines sont pauvres en systèmes de réparation de lésions oxydées de l'ADN.

Le test des comètes réalisé dans des conditions standard sur cellules L5178Y de lymphome de souris traitées avec des nanoparticules d'argent (taille moyenne de 5 nm) est négatif (Mei, Zhang *et al.* 2012) ; néanmoins, une augmentation dose-dépendante a été notée au cours de l'essai modifié dans lequel des endonucléases permettant de mettre en évidence des lésions oxydatives de l'ADN ont été ajoutées. Ces résultats corroborés par l'analyse de l'expression génique (modulation de l'expression de gènes impliqués dans la production d'ERO) suggèrent l'induction de stress oxydatif.

Concernant les mutations géniques *in vitro* :

L'ensemble des essais réalisés sur bactéries s'est révélé négatif (Kim, Park *et al.* 2013; Li, Chen *et al.* 2012). Toutefois, les doses maximales testées sont relativement faibles, ce qui soulève la question de la pertinence de ces résultats. En effet, les toxicologues considèrent en général comme peu pertinent l'absence de mutagenèse dans le test d'Ames à des doses inférieures à 250 µg/boîte (Kenyon, Cheung *et al.* 2007; Müller, Mauthe *et al.* 2006). De plus, l'absence de démonstration de la capacité de pénétration des parois et des membranes bactériennes par des nanoparticules d'argent interroge sur la pertinence de ce type d'essais réalisés sur procaryotes.

⁵² Le test des comètes est un test d'altérations primaires de l'ADN qui est utilisé pour la détection des cassures de brins d'ADN dans des cellules ou des noyaux isolés préalablement exposés à une substance d'essai. Dans des conditions alcalines (pH > 13), il peut détecter des cassures simple et double brin d'ADN, les sites alcali-labiles ou encore les sites incomplets de réparation par excision-resynthèse.

Réalisée *in vitro*, la quantification du pourcentage d'ADN ayant migré s'effectue après traitement direct de cultures de cellules avec des suspensions de nanoparticules d'argent.

Ainsi, des résultats négatifs sur un système bactérien sont donc à prendre avec beaucoup de réserve.

Au cours du test de mutation génique sur cellules L5178Y de lymphome de souris (test MLA/TK), des nanoparticules d'argent (taille moyenne de 5 nm) ont induit une augmentation significative du nombre de mutants à des doses comprises entre 3 et 6 µg/ml. L'activité mutagène des nanoparticules d'argent de 5 nm observée dans les cellules de lymphome de souris semble en particulier liée à l'induction de stress oxydatif (Mei, Zhang *et al.* 2012).

Concernant les aberrations chromosomiques *in vitro* :

Les résultats des tests du micronoyau et d'analyse de métaphases *in vitro* réalisés sur divers nanoparticules d'argent et schémas de traitement utilisant des types cellulaires de différentes origines sont résumés ci-dessous :

- l'induction de micronoyaux s'est révélée être relativement faible (< 3) sur des cellules bronchiques humaines Beas-2B (Kim, Kim *et al.* 2011) traitées pendant 24 heures à des concentrations allant de 0,01 à 10 µg/ml avec des nanoparticules d'argent (43 nm) (Kim, Kim *et al.* 2011 ;
- une augmentation significative de la fréquence de cellules micronucléées (effet plus faible en présence de cystéine comme substance antioxydant) est observée sur des cellules hépatiques humaines HepG2 (Kawata, Osawa *et al.* 2009) traitées pendant 24 heures à la concentration unique de 1 µg/ml avec des nanoparticules d'argent (7 - 10 nm) Kawata, Osawa *et al.* 2009). Les auteurs concluent que les nanoparticules d'argent et les ions Ag⁺ contribuent aux effets (géo)toxiques des nanoparticules d'argent ;
- une augmentation de la fréquence de micronoyaux avec des rapports d'induction de l'ordre de 2 à 3 fois est observée sur des fibroblastes pulmonaires humains normaux (IMR-90) et des cellules de glioblastome humain (U251) (AshaRani, Low Kah Mun *et al.* 2009) traités avec des concentrations de 100 et 200 µg/ml de nanoparticules d'argent comportant un revêtement à base d'amidon ;
- une induction de micronoyaux relativement faible (< 3) est observée sur des cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 (Li, Chen *et al.* 2012) traitées par des concentrations allant de 10 à 30 µg/ml de nanoparticules d'argent (4 - 12 nm) pendant 28 heures. Cette observation est faite pour les deux concentrations maximales testées (25 et 30 µg/ml) qui présentent par ailleurs des niveaux de cytotoxicité relativement importants. Toutefois, ces résultats ont été considérés comme équivoques par les auteurs ;
- une proportion de cellules aberrantes avec réarrangements chromosomiques a été observée sur des lymphocytes humains (Ernest, George Priya Doss *et al.* 2013) traités pendant 24 heures avec 15 µg/ml et 25 µg/ml de nanoparticules d'argent (diamètre approximatif inférieur à 100 nm). Des proportions de 8 et 24 % de cellules aberrantes ont été trouvées respectivement à 15 et 25 µg/ml de nanoparticules d'argent avec présence de réarrangements chromosomiques de type tri-radial (ce type d'effet doit être considéré comme un marqueur de clastogénèse) ;
- aucune induction significative de micronoyaux n'est observée sur des cellules V79 de poumon de hamster chinois (Böhmert, Niemann *et al.* 2012) traitées à la concentration maximale de 25 ou 50 µg/ml respectivement pour les nanoparticules d'argent de taille moyenne de 20 et 40 nm (recouvertes d'un peptide de motif Cys-Lys-Lys).. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution étant donné qu'aucun résultat n'est présenté ;
- sur des cellules ovariennes de hamster chinois CHO-K1 traitées :
 - o pendant 24 h (de 0,488 à 1,953 µg/ml) ou 6 h en présence d'un système d'activation métabolique (S9-mix) (de 7,813 à 31,25 µg / ml) ou sans (de 0,977 à 3,906 µg/ml) avec des nanoparticules d'argent (taille moyenne de 10 nm, présence de revêtement non précisé). Aucune augmentation de la fréquence d'aberrations

chromosomiques ni structurales, ni numériques est observée (Kim, Song *et al.* 2013)⁵³ ;

- o pendant 24 h avec des nanoparticules d'argent (taille approximative de 58,9 nm, aucun revêtement indiqué). Une augmentation de type « dose-dépendante » de la fréquence de micronoyaux (0,1 à 10 µg/mL ; avec et sans S9-mix) est observée (Kim, Park *et al.* 2013).

Concernant les différents mécanismes d'action *in vitro* :

Différents mécanismes d'action peuvent être responsables de l'effet génotoxique *in vitro* de nanoparticules d'argent, tels que :

- l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), due à la pénétration des particules à travers la membrane cellulaire ;
- la libération d'ions Ag⁺ à partir des nanoparticules d'argent dans le milieu de culture ;
- la surface des nanoparticules d'argent chargée positivement permettant l'interaction avec l'ADN chargé négativement (El Badawy, Silva *et al.* 2011; Johnston, Hutchison *et al.* 2010; Kim, Kim *et al.* 2011; Nymark, Catalán *et al.* 2013).

Concernant l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)

D'après de nombreuses publications, la toxicité des nanoparticules d'argent semble être provoquée en premier lieu par l'augmentation des niveaux d'ERO qui serait à l'origine de son activité mutagène et génotoxique lorsqu'elle est mise en évidence, mais également par d'autres phénomènes toxiques tels que la nécrose, l'apoptose et l'inflammation. La production d'ERO a été démontrée dans plusieurs modèles et à l'aide de diverses méthodes.

L'induction de stress oxydatif révélée par l'analyse de l'expression génique a été impliquée dans l'activité mutagène *in vitro* de nanoparticules d'argent vis-à-vis de cellules de lymphome L5178Y (Mei, Zhang *et al.* 2012). L'oxydation, mesurée par la technique DC-FDA, pourrait être responsable de la génotoxicité *in vivo* au niveau de la moelle osseuse de souris (Ghosh, J *et al.* 2012).

Plusieurs études *in vitro* réalisées avec des nanoparticules d'argent ont confirmé la corrélation entre augmentation des niveaux d'ERO et apoptose (Foldbjerg, Dang *et al.* 2011; Sanpui, Chattopadhyay *et al.* 2011). Les ERO formées agiraient directement mais également indirectement. Par exemple, la production accrue d'ERO affecterait la chaîne respiratoire mitochondriale et augmenterait ainsi la quantité de protéines non-repliées ou mal repliées dans le réticulum endoplasmique (RE), induisant un stress du RE et une réponse de la protéine mal repliée. Ces deux types de dommages cellulaires conduisent à une nouvelle génération d'ERO, à des lésions de l'ADN et à l'activation de diverses voies de signalisation menant à de l'inflammation et à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Bartłomiejczyk, Lankoff *et al.* 2013).

Concernant la libération d'ions Ag⁺ à partir des nanoparticules d'argent dans le milieu de culture

Il apparaît essentiel de tenter de définir s'il existe un « effet nano » pour les nanoparticules d'argent, ce qui revient à estimer la part de toxicité due à la libération d'Ag⁺ et celle qui serait liée à l'état nanoparticulaire des nanoparticules d'argent. À ce jour, l'interaction des composés cellulaires avec les ions Ag⁺ dissous et/ou la forme nanoparticulaire n'est pas complètement élucidée. Certains auteurs concluent que les effets toxiques observés avec les nanoparticules d'argent sont provoqués à la fois par les ions Ag⁺ et par la forme nanoparticulaire.

Eom et Choi (Eom and Choi 2010) et Foldbjerg *et al.* (Foldbjerg, Dang *et al.* 2011) ont démontré que les nanoparticules d'argent induisent des niveaux d'ERO supérieurs à ceux induits par les ions Ag⁺ après 24 h d'exposition. De plus, des augmentations d'expression des facteurs de transcription ainsi que l'accumulation de dommages de l'ADN et l'induction d'apoptose ont été

⁵³ Ces résultats sont douteux car aucune métaphase n'est observée après 24h.

observés avec des nanoparticules d'argent, alors que ces effets ne sont pas évidents avec les ions Ag^+ (Eom and Choi 2010).

Dans l'étude de Grodmazka *et al.* (2012), même si les effets observés n'apparaissent pas pertinents, une augmentation de la fragmentation de l'ADN est observée dans les cellules germinales dans les 2 groupes traités avec 5 et 10 mg/kg de nanoparticules d'argent (20 ± 5 nm) alors que les nanoparticules d'argent de plus grande taille (200 ± 50 nm) n'ont entraîné aucune différence significative quel que soit le temps de prélèvement. De la même façon, l'induction de recombinaison somatique observée avec des nanoparticules d'argent contrastent avec les résultats négatifs obtenus avec la forme ionique de l'argent testée sous forme d' AgNO_3 (Demir, Vales *et al.* 2011). À l'inverse, dans les 2 lignées cellulaires étudiées par Cronholm *et al.* (2013), les ions Ag^+ dissous à partir d' AgNO_3 induisent bien plus d'altération membranaire que les nanoparticules d'argent qui ne provoquent aucun effet, et ce malgré l'absorption plus élevée d'Ag. Ainsi, les espèces ioniques induisent plutôt une toxicité agissant sur la membrane cellulaire, indépendamment de l'absorption. Les nanoparticules d'argent n'agissent pas par un effet cheval de Troie. Dans cette étude, en dépit de la bonne absorption, l'absence de toxicité observée avec les nanoparticules d'argent est probablement due à la faible libération intracellulaire d'ions Ag^+ (Cronholm, Karlsson *et al.* 2013).

La libération d'ions Ag^+ libres peut en effet contribuer en partie, mais pas entièrement, aux effets toxiques observés avec les nanoparticules d'argent (Gaiser, Fernandes *et al.* 2012; Laban, Nies *et al.* 2009). Des études récentes confirment que la toxicité des nanoparticules d'argent est partiellement due à la libération d'ions argent (Gorth, Rand *et al.* 2011; Loeschner, Hadrup *et al.* 2011). La publication de Foldbjerg (2012) démontre une différence considérable entre les profils d'expression géniques de cellules épithéliales de poumon humain A549 traitées avec des nanoparticules d'argent (plus de 1 000 gènes modulés plus de 2 fois) ou avec des ions Ag^+ (133 gènes modulés plus de 2 fois) et ce même si ces derniers induisent un « stress oxydant ».

La dose intracellulaire d'ions Ag^+ est plus élevée quand les cellules ont été exposées aux nanoparticules d'argent comparativement aux formes ioniques testées sous forme de sels d' AgNO_3 (Cronholm, Karlsson *et al.* 2013). Le mécanisme de libération des ions Ag^+ à partir des nanoparticules d'argent fait intervenir à la fois des processus chimiques et électrochimiques. La libération de l'Ag des nanoparticules d'argent génère des intermédiaires peroxydes comme H_2O_2 très réactif et qui interagit rapidement avec les biomolécules ou l'Ag métallique, formant ainsi des oxydes ou hydroxydes à la surface des agglomérats de nanoparticules d'argent.

L'internalisation des nanoparticules d'argent dans les cellules semble plus importante que celle des sels solubles d'Ag qui sont peu ou pas absorbés par les cellules. De plus, les ions argent contenus dans des sels d'Ag peuvent également former des complexes et des colloïdes avec les éléments du milieu cellulaire, comme le montrent les résultats obtenus par DLS avec l' AgNO_3 (Cronholm, Karlsson *et al.* 2013). Ces processus compliquent la comparaison directe entre les résultats d'absorption de l'Ag sous forme particulaire et ionique.

7.2.3.2 Génotoxicité *in vivo*

Dans le rapport de l'Anses de mars 2010, seul un test du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse chez le rat, après exposition par voie orale selon la ligne directrice OCDE 471, était disponible dans la littérature (Kim, Kim *et al.* 2008). Depuis, de nouvelles études évaluant l'induction de fragmentation de l'ADN ou d'aberrations chromosomiques *in vivo* ont été publiées. Toutefois, ces études sont peu nombreuses et concernent différentes nanoparticules d'argent. Il est donc difficile d'évaluer le danger génotoxique *in vivo* des nanoparticules d'argent. Des études utilisant une voie d'exposition représentative d'une exposition humaine devraient être entreprises pour déterminer si les nanoparticules d'argent peuvent présenter un danger génotoxique *in vivo*.

Concernant les altérations primaires de l'ADN *in vivo* :

Des études récentes sur les altérations primaires de l'ADN *in vivo* montrent que des nanoparticules d'argent sont capables d'induire, dans certaines conditions, une fragmentation de l'ADN telle que mesurée dans le test des comètes. Toutefois, les résultats sont contradictoires

selon la voie de traitement, l'espèce animale utilisée et les nanoparticules d'argent testées, comme décrit ci-après.

Dans la publication de Ghosh *et al.* (Ghosh, J *et al.* 2012), le test des comètes réalisé sur cellules de moelle osseuse de souris mâles (Swiss), traitées par voie intra-péritonéale, à des doses uniques allant de 10 à 80 mg/kg de nanoparticules d'argent (90 à 180 nm) a permis de mettre en évidence une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN. L'effet est maximum à la dose de 20 mg/kg. De même, aux doses de 10 et 20 mg/kg, une augmentation de la concentration d'ERO au niveau des cellules de moelle osseuse est observée (utilisation de la technique DC-FDA). En revanche, cet effet génotoxique n'est pas retrouvé par Cho *et al.* lors du test des comètes sur les cellules de la moelle osseuse de rats mâles (Sprague Dawley) traités pendant 12 semaines en chambre d'inhalation (corps entier, 6 h/j) à des doses allant de 49 à 381 µg/m³ de nanoparticules d'argent (14 à 15 nm de diamètre) et un recueil 24 h après la dernière exposition (Cho, Sung *et al.* 2013). Ces résultats contradictoires et les différences expérimentales conduisent à ce jour à l'impossibilité d'attribuer l'origine de la positivité à un paramètre précis ni-même de garantir que cet effet soit avéré.

Un autre exemple de résultat de test des comètes, décrit ci-après, doit également être considéré avec réserve. Grodmazka-Ostrowska *et al.* (2012) ont réalisé le test des comètes sur des cellules germinales de rats mâles (Wistar), pour différents temps de prélèvement (24 h, 7 et 28 jours) après traitement par injection unique de particules d'argent (200 ± 50 nm) et de nanoparticules d'argent (20 ± 5 nm). Les doses injectées sont de 5 et 10 mg/kg pour les nanoparticules d'argent (20 ± 5 nm) ou de 5 mg/kg pour les particules d'Ag (200 ± 50 nm). Elles ont été administrées par voie intraveineuse. Quelles que soient les doses de nanoparticules d'argent utilisées, la fragmentation de l'ADN dans les cellules germinales a significativement augmenté, et ce, exclusivement pour un temps de prélèvement de 24 h (aucun effet sur les prélèvements de 7 et 28 jours après l'injection). De même, les particules d'Ag (200 ± 50 nm) n'ont entraîné aucun effet significatif quel que soit le temps de prélèvement. Néanmoins, les recommandations internationales précisent qu'il est essentiel d'effectuer le recueil des cellules d'intérêt très précocement (entre 2 et 6 heures après le dernier traitement) car les lésions de l'ADN sont rapidement et efficacement réparées. Aussi, l'effet significatif observé au niveau testiculaire chez le rat, exclusivement 24 heures après une injection, pose question quant à son interprétation. La spermatogenèse chez le rat dure plus de 40 jours ; si l'atteinte des cellules germinales était réelle, alors l'effet aurait également été observé à des temps ultérieurs. De plus, le test des comètes apparaît inapproprié pour l'évaluation de la génotoxicité au niveau des cellules germinales matures, ces cellules présentant des niveaux élevés de fragmentation « spontanée » de l'ADN (Speit, Vasquez *et al.* 2009). Par ailleurs, il aurait fallu dans cette expérience se rapprocher d'un pH de 7 plutôt que 13 comme spécifié. Pour toutes ces raisons, la conclusion des auteurs quant à un effet sur les cellules germinales semble discutable.

De manière plus générale, les voies de traitement menant à ces résultats positifs (voies intrapéritonéale et intraveineuse) ne sont en aucun cas représentatives d'une exposition humaine et le niveau de dose utilisé est très important (jusqu'à 80 mg/kg p.c./jour pour la voie intrapéritonéale). Aussi, tous ces résultats sont donc à considérer avec beaucoup de prudence.

Concernant les aberrations chromosomiques *in vivo*

Quelques essais d'aberrations chromosomiques *in vivo* sont disponibles. L'étude de Song *et al.* (2012) a mis en évidence une augmentation significative du nombre de micronoyaux sur cellules du sang périphérique exclusivement au temps de prélèvement de 48 h après une administration unique intra-péritonéale de 3 mg/animal de nanoparticules d'argent (< 100 nm) chez la souris femelle. Cet effet est accompagné d'une augmentation du niveau de guanines oxydées (8-OHdG) dans les urines des souris traitées alors qu'aucune augmentation n'a été notée au niveau du foie. L'étude de Ghosh *et al.* (2012) a également montré une augmentation significative du nombre d'aberrations chromosomiques sur cellules de moelle osseuse de souris mâles traitées par voie intra-péritonéale à des doses uniques allant de 10 à 80 mg/kg de nanoparticules d'argent (90 à 180 nm).

Cet effet génotoxique n'a pas été retrouvé au cours du test des micronoyaux *in vivo* réalisé au niveau de la moelle osseuse selon la ligne directrice OCDE 474. Kim *et al.* ont exposé des rats Sprague-Dawley (mâles et femelles) à des nanoparticules d'argent (diamètre 18 nm) par voie pulmonaire (chambre d'inhalation, corps entier), 6 h/j pendant 90 jours aux concentrations comprises entre 0,7 (faible dose) et $2,9 \times 10^6$ particules/cm³ (forte dose) (Kim, Sung *et al.* 2011). Les essais ont été réalisés dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Les résultats n'ont montré aucune différence statistiquement significative dans les fréquences de MNPCE (*Micronucleated polychromatic erythrocytes* - érythrocytes polychromatiques micronucléés) permettant d'estimer la génotoxicité, par rapport au groupe non traité quelle que soit la dose testée. Il faut néanmoins préciser qu'aucun signe de toxicité (indiqué par le calcul du rapport PCE/NCE) n'a été observé, ce qui soulève la question de la réalité de l'exposition de la moelle osseuse, organe cible dans ce système d'essai.

Concernant les mutations géniques *in vivo*

À ce jour, une seule étude porte sur l'évaluation de l'activité mutagène *in vivo* des nanoparticules d'argent (Demir, Vales *et al.* 2011). Elle porte l'induction de mutations et de recombinaisons somatiques (SMART) au niveau des ailes de *Drosophila melanogaster* traitées au 3^{ème} stade larvaire à des concentrations allant de 0,1 à 10 mM de nanoparticules d'argent (taille < 60 nm). Les résultats ont montré de faibles augmentations mais significatives, de la fréquence de mutations ponctuelles en particulier par l'induction de recombinaisons somatiques. En revanche, l'utilisation de la forme ionique de l'argent (AgNO₃) conduit à des résultats négatifs. Cet essai de mutation chez *Drosophila melanogaster* n'est pas un test standard réglementaire pour lequel il existe une ligne directrice OCDE ou une validation internationale. Aussi, il est difficile d'appréhender et de conclure sur la signification d'un effet qualifié de faible et d'extrapoler ces résultats aux mammifères.

Concernant les différents mécanismes d'action *in vivo* :

L'implication des ERO a été démontrée *in vivo* chez le rat mâle avec une augmentation d'anions superoxydes (O₂^{•-}) au niveau hépatique et cardiaque (Ebabe Elle, Gaillet *et al.* 2013). Les auteurs indiquent que lorsque le niveau d'ERO est trop important et dépasse la capacité des systèmes antioxydants, les cellules sont alors exposées à un « stress oxydant » qui maintient un état inflammatoire (2 cytokines, *i.e.* TNF- α et IL-6). Cet exemple, bien que démonstratif, souligne toutefois qu'un niveau de dose considérable (500 mg/kg/j) sur une longue période (81 jours, soit une dose cumulée de 40,5 g/kg) doit être utilisé pour dépasser ces systèmes de protection. De plus, les ions Ag⁺ sont susceptibles d'interagir avec les groupements thiols des protéines pouvant alors conduire à leur inactivation. En effet, les ions Ag⁺ forment des complexes notamment avec les groupes sulfhydryle, du GSH (glutathion réduit), dans de nombreux types cellulaires (Chen and Schluesener 2008). Néanmoins, certaines études ne montrent pas de changement de concentrations de GSH *in vitro* (sur cellules C3A) ou *in vivo* dans les hépatocytes de rats (Gaiser *et al.* 2012).

7.2.3.3 Discussion sur la génotoxicité *in vitro* et *in vivo*

Il est aujourd'hui reconnu que l'origine des lignées cellulaires utilisées peut directement impacter la nature de la réponse mutagène et/ou génotoxique en fournissant des résultats qualifiés de faussement positifs.

Le choix des lignées cellulaires est donc très important. Par exemple, les travaux de Honma et Hayashi (Honma and Hayashi 2011) et de Fowler *et al.* (Fowler, Smith *et al.* 2012) ont confirmé que les tests de génotoxicité *in vitro* sur cellules de rongeurs sont positifs alors que les résultats de génotoxicité *in vivo* sont négatifs. Cette faiblesse de prédictivité s'explique par la déficience en protéine P53 *in vitro* qui semble jouer un rôle clé. Il est donc important de sélectionner un type cellulaire bien caractérisé et provenant d'un organe primo-exposé ou d'un organe cible suite à une exposition à des nanoparticules d'argent. Il semble également préférable d'utiliser des cellules d'origine humaine, proficientes P53, stables sur le plan caryotypique et munies de systèmes antioxydants efficaces. L'utilisation de fibroblastes est en revanche discutable puisqu'il s'agit de cellules de soutien, non jointives, et il apparaît préférable d'utiliser des cellules épithéliales,

formant des jonctions serrées (paramètre sans doute très important pour les études de suspensions de nanoparticules d'argent *in vitro*). De manière systématique, le choix du type cellulaire devrait être clairement justifié.

Concernant les doses utilisées dans les études *in vitro*, la majeure partie des études publiées utilisent des concentrations élevées (jusqu'à 200 µg/mL). Ces doses peuvent être considérées comme excessives et irréalistes pour des suspensions nanoparticulaires.

Les temps de traitement ont aussi leur importance. Les études utilisent divers temps continus de traitement pouvant être considérés comme relativement longs (de 24 à 72 h) en particulier pour le test des comètes. Bien qu'à ce jour il n'existe pas de ligne directrice permettant d'harmoniser le protocole du test des comètes *in vitro*, des panels d'experts recommandent cependant un temps d'exposition des cellules court, de l'ordre de 3 à 6 h (Hartmann, Plappert *et al.* 2003; Tice, Agurell *et al.* 2000).

Les tests mettant en évidence des altérations primaires de l'ADN *in vitro* (test des comètes) conduisent fréquemment à des résultats positifs. Toutefois la pertinence de ces effets au regard des conditions expérimentales reste très discutable.

Les tests d'aberrations chromosomiques *in vitro* (test du micronoyau et analyse de métaphases) montrent des résultats faiblement positifs ou négatifs en fonction des conditions expérimentales, rendant impossible une conclusion définitive quant au potentiel d'induction d'aberrations chromosomiques par des suspensions de nanoparticules d'argent.

À propos des tests de mutation génique *in vitro*, l'utilisation de systèmes bactériens (ex : test d'Ames) n'est pas recommandée et des résultats négatifs dans ces tests n'apparaissent pas pertinents. Parallèlement, les tests de mutation génique validés sur cellules de mammifères sont effectués sur des modèles cellulaires murins transformés, (L5178Y, V79,...), remettant en cause leur prédictivité vis-à-vis des expérimentations *in vivo*.

Concernant les études *in vivo*, les protocoles expérimentaux mis en œuvre sont également très divers sur le plan de l'espèce animale, de l'organe étudié, de la voie d'exposition choisie, du paramètre mesuré, *etc.*

Concernant le test des comètes *in vivo*, les résultats récents sont contradictoires avec notamment, un test positif (Ghosh, J *et al.* 2012) et un test négatif (Cho, Sung *et al.* 2013) par voie respectivement intra-péritonéale et inhalation. La contradiction entre les résultats et les différences expérimentales des études rendent à ce jour impossible la garantie de l'effet avéré ni même l'attribution d'un paramètre précis expliquant le résultat positif des études. De plus, le test des comètes semble inapproprié pour l'évaluation de la génotoxicité au niveau des cellules germinales matures. En effet, le nombre de fragmentations « spontanées » de l'ADN dans ces cellules (Speit, Vasquez *et al.* 2009), ainsi qu'un protocole expérimental utilisant un pH de 13 au lieu de la neutralité, incitent à considérer ces résultats avec beaucoup de prudence. Enfin, les voies de traitement menant aux résultats positifs (voies intra-péritonéale et intraveineuse) ne sont en aucun cas représentatives d'une possible exposition humaine et du niveau de dose utilisé (dose trop importante, jusqu'à 80 mg/kg p.c./ jour pour la voie intra-péritonéale).

Trois essais d'aberrations chromosomiques *in vivo* sont également disponibles :

- l'étude Song *et al.* (2012) qui a mis en évidence une augmentation significative du nombre de micronoyaux sur cellules du sang périphérique exclusivement au temps 48 h après une administration intra-péritonéale unique de 3 mg/animal de nanoparticules d'argent chez la souris femelle ;
- l'étude de Ghosh *et al.* (2012) qui a montré une augmentation significative du nombre d'aberrations chromosomiques sur cellules de moelle osseuse de souris mâles traitées par voie intra-péritonéale à des doses uniques allant de 10 à 80 mg/kg de nanoparticules d'argent ;
- l'étude de Kim, Sung, *et al.* (2011) qui ne montre pas d'augmentation significative du nombre de micronoyaux dans les érythrocytes de la moelle osseuse de rats mâles et femelles exposés par voie pulmonaire (chambre d'inhalation) 6 heures / jour pendant

90 jours à des faibles doses ($0,7 \times 10^6$ particules/cm³) ou des fortes doses ($2,9 \times 10^6$ particules/cm³).

La seule évaluation de l'activité mutagène *in vivo* des nanoparticules d'argent a été réalisée chez la drosophile. Cet essai de mutation chez *Drosophila melanogaster* n'est pas un test standard réglementaire pour lequel existe une ligne directrice OCDE ou une validation internationale. Aussi, il est difficile d'appréhender et de conclure sur la signification d'un effet qualifié de faible et d'extrapoler ces résultats aux mammifères.

Ainsi, les études disponibles sur la génotoxicité *in vivo* des nanoparticules d'argent sont peu nombreuses et concernent des nanoparticules d'argent avec des caractéristiques physico-chimiques différentes. Il n'est donc pas possible de conclure quant à un danger génotoxique *in vivo* des nanoparticules d'argent sur la base de la littérature actuelle.

Différents mécanismes d'action peuvent être responsables de l'effet génotoxique de nanoparticules d'argent, tels que :

- la libération d'ions Ag⁺ à partir des particules dans le milieu de culture ;
- l'induction d'ERO, due à la pénétration des nanoparticules d'argent à travers la membrane cellulaire ;
- la surface des nanoparticules d'argent chargée positivement permettant l'interaction avec l'ADN chargé négativement (El Badawy et al. 2011, Johnston et al. 2010, Nymark et al. 2013, Kim, Kim, et al. 2011).

L'internalisation des nanoparticules d'argent dans les cellules semble plus importante que celle des sels solubles d'Ag, qui sont peu ou pas absorbés par les cellules. De plus, les ions argent contenus dans les sels d'Ag peuvent également former des complexes et des colloïdes avec les éléments du milieu cellulaire, comme le montrent les résultats obtenus par DLS avec l'AgNO₃ (Cronholm, Karlsson *et al.* 2013). Ces processus compliquent la comparaison directe entre les résultats d'absorption de l'Ag sous forme particulaire et ionique.

Il apparaît essentiel d'estimer la part de toxicité due à la libération d'Ag⁺ et celle qui serait liée aux nanoparticules, en d'autres termes, de définir s'il existe un « effet nano » pour les nanoparticules d'argent. À ce jour, il n'est pas élucidé si les ions Ag⁺ dissous et/ou la forme particulaire interagissent avec les composés cellulaires. Certains auteurs concluent que les effets toxiques observés avec les nanoparticules d'argent sont provoqués à la fois par les ions Ag⁺ et par la forme particulaire.

7.2.4 Toxicités spécifiques

7.2.4.1 Inflammation

In vitro

Le rapport de l'Anses « *Nanomatériaux et produits de consommation* » de mars 2010 précisait que l'augmentation significative de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation était indépendante de la taille des nanoparticules d'argent (Carlson, Hussain *et al.* 2008).

Les propriétés inflammatoires des nanoparticules d'argent sont en fait controversées. Certains auteurs montrent une augmentation de production de médiateurs de l'inflammation (interleukines, cytokines,...) libérés dans le milieu par exemple par des macrophages (Martínez-Gutierrez, Thi *et al.* 2011) ou par des cellules hépatiques (Gaiser, Fernandes *et al.* 2012; Kermanizadeh, Gaiser *et al.* 2012). D'autres auteurs concluent au contraire à l'absence d'induction de l'inflammation. Par exemple, Yen *et al.* (Yen, Hsu *et al.* 2009) ne détectent aucune augmentation significative de l'expression de 3 gènes de l'inflammation étudiés (IL-1, IL-6 et TNF-α), quel que soit le temps de traitement sur des macrophages murins (cellules J774 A1) traités (3, 6, 24, 48 et 72 heures) avec 1 ppm de nanoparticules d'argent de 3 tailles différentes (2 à 4 nm ; 5 à 7 nm ; 20 à 40 nm)..

Trickler *et al.* (2010) montrent que le relargage de médiateurs pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β, et PGE2) par des cellules endothéliales vasculaires cérébrales primaires de rat dépend de la taille

des nanoparticules d'argent (25 nm > 40 nm > 80 nm) et du temps de traitement (8 h > 4 h > 2 h). Cet effet est corrélé à l'augmentation de perméabilité de la monocouche cellulaire.

Il semblerait qu'en fonction des cellules, des conditions de traitement et des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argents, seuls certains médiateurs soient induits et pas d'autres. Ainsi, d'après Kermanizadeh *et al.* (2012), les nanoparticules d'argent (NM 300) induisent une augmentation du niveau de production d'IL-8 (cytokine inflammatoire impliquée dans l'initiation et l'attraction des neutrophiles) mais pas de l'IL-6, du TNF- α ou de la protéine C réactive (CRP)⁵⁴ dans les cellules humaines d'origine hépatique C3A après 24 heures de traitement.

In vivo

Dans l'étude de Stebounova *et al.* (2011) citée préalablement, une réponse inflammatoire après traitement par inhalation a été détectée chez la souris. Cet effet est démontré par comptage cellulaire dans le liquide broncho-alvéolaire, bien que peu d'effet sur la production de cytokines ait été noté. De même, des réactions inflammatoires ont été observées au niveau de l'intestin, du poumon et du foie (Heydarnejad, Yarmohammadi-Samani *et al.* 2014; Lee, Liu *et al.* 2013; Shahare and Yashpal 2013; Sung, Ji *et al.* 2009; Wang, Qu *et al.* 2013; Xue, Zhang *et al.* 2012).

Wong *et al.* (2009) décrivent plutôt un effet anti-inflammatoire *in vivo* sur la formation d'adhérences post-chirurgicales dans l'abdomen.

Suite à une exposition subchronique par injection IV d'une solution de nanoparticules d'argent, aucune réaction inflammatoire au niveau du foie et des ganglions lymphatiques est observée tandis qu'une accumulation des nanoparticules d'argent dans les cellules de Kupffer et dans les ganglions lymphatiques est constatée. Cependant, l'augmentation des granulocytes neutrophiles au niveau circulant indique bien une réponse inflammatoire (De Jong, Van Der Ven *et al.* 2013).

Xu et ses collaborateurs (Xu, Tang *et al.* 2013) rapportent une augmentation du nombre total de leucocytes et de la concentration en cytokines (TNF- α et IFN- γ) dans le péritoine (lavage de fluide abdominal), 48 h après l'administration IP de nanoparticules d'argent (< 100 nm) à 2 mg/kg à des souris Balb/c femelles.

7.2.4.2 Immunotoxicité

In vitro

Des effets cytotoxiques des nanoparticules d'argent sur les macrophages péritonéaux ont été observés à partir d'une concentration de 10 μ g/ml et pour 24 h d'incubation (50 % environ de toxicité à 20 μ g/ml). De plus, lors de l'essai à 10 μ g/ml, une augmentation de l'expression des molécules du CMH⁵⁵ classe II présent à la surface des macrophages, qui traduit le déclenchement de la réponse immunitaire (réponse immune adaptative), est observée. Toutefois, aucune incorporation des antigènes par les macrophages n'est constatée (Xu, Tang *et al.* 2013).

In vivo

L'administration IP de nanoparticules d'argent à des concentrations de 2 et 10 mg/kg stimule l'augmentation des taux d'IgG sériques avec un effet dose-dépendant. Un effet similaire est observé pour une administration en sous-cutanée, mais uniquement à 2 mg/kg. Ainsi, les nanoparticules d'argent testées sont considérées comme des adjuvants immuns de type Th2 (ratio IgG1 /IgG2) (Xu, Tang *et al.* 2013). De même, après traitement IV chez des rats pendant 28 jours avec des nanoparticules d'argent (20 nm et 100 nm), De Jong *et al.* (2013) observent une élévation des taux sériques en IgM et IgE, l'augmentation des populations de cellules B, T et *Natural Killer* (NK) de la rate, la suppression quasi-totale de l'activité des NK et des modifications de production de cytokines (variables selon les nanoparticules d'argent étudiées). Par contre, Van der Zande *et al.* (2012) concluent à l'absence de réponse immune non-spécifique, car ils

⁵⁴ Protéine synthétisée par le foie principalement mais aussi par le tissu adipeux et qui joue un rôle dans le système immunitaire.

⁵⁵ Complexe majeur d'histocompatibilité.

n'observent aucun de ces effets après une administration par gavage pendant 28 jours avec 90 mg/kg d'Ag < 20 nm et Ag-PVP < 15 nm.

7.2.4.3 Coagulation

Quelques effets sur la coagulation ont également été rapportés :

- *in vitro*, inhibition dose dépendante (entre 0,05 et 5 μ M) de la réponse des plaquettes médiée par les intégrines (adhésion au fibrinogène immobilisé, réorganisation de l'actine F et du cytosquelette, rétraction du caillot de fibrine) (Bandyopadhyay, Baruah *et al.* 2012) ;
- *in vitro*, induction de l'agrégation de plaquettes et de l'effet pro-coagulant après 5 min d'exposition à partir de 100 μ g/ml avec des nanoparticules d'argent (< 100 nm), l'activation des plaquettes étant visualisée également par le développement de pseudopodes suite au traitement avec nanoparticules d'argent (Jun, Lim *et al.* 2011) ;
- *in vivo*, augmentation de l'agrégation des érythrocytes chez les femelles traitées avec la plus forte dose (3×10^6 particules/cm³) pendant 13 semaines en chambre d'inhalation (Sung *et al.* 2009) ;
- *in vivo*, agrégation des plaquettes et formation d'un thrombus veineux favorisé chez le rat traité avec 0,05 à 1 mg/kg IV ou 5 à 10 mg/kg en instillation intra-trachéale (Jun, Lim *et al.* 2011).

7.2.4.4 Tératogenèse / toxicité pour la reproduction

Peu d'études sont encore disponibles sur les effets des nanoparticules d'argent sur les fonctions de reproduction et sur la tératogenèse.

Études *in vitro*

Sur les gamètes mâles, l'étude de Mirshokraei *et al.* (Mirshokraei, Hassanpour *et al.* 2011) sur du sperme de mouton montre que les nanoparticules d'argent (Nanocid) provoquent l'immobilité complète des spermatozoïdes à 10 μ g/ml dès 30 min de contact, alors que l'étude de Tiedemann *et al.* (2014) sur gamètes de porc montre que les paramètres de vitalité du sperme (motilité, intégrité membranaire et morphologie) ne sont pas affectés par les nanoparticules d'argent.

Sur les gamètes femelles, les nanoparticules d'argent inhibent la maturation des cumulus-oocytes avec une accumulation dans la zone cellulaire du cumulus entourant les oocytes (Tiedemann, Taylor *et al.* 2014).

Sur les œufs fécondés, l'exposition de blastocystes de souris à des nanoparticules d'argent de 13 nm à 50 μ M pendant 24 h induit une diminution du nombre total de cellules par embryon (environ 35 %) corrélée à une faible augmentation de l'apoptose (3 à 6 fois par rapport au niveau contrôle) à la fois dans la masse cellulaire interne et dans le trophoctoderme⁵⁶. De plus, un traitement au stade morula (50 μ mol/L de nanoparticules d'argent pendant 24 h), diminue le nombre d'œufs passant au stade blastocyste. Le traitement aux nanoparticules d'argent affecte également l'implantation et le potentiel à se développer en embryons après implantation. Pour confirmer ces effets, les blastocystes ont été réimplantés *in vivo*. Comme *in vitro*, le taux d'implantation des traités (50 μ mol/L 24h) est inférieur à celui des contrôles. De plus, la proportion d'embryons implantés qui ne se développent pas normalement est plus élevée chez les traités. Par ailleurs, les poids du placenta et des fœtus sont plus faibles. Des différences de toxicité entre les nanoparticules d'argent et les ions Ag⁺ sont observées, les ions Ag⁺ étant plus toxiques (Li, Kuo *et al.* 2010) mais les concentrations en ions relargués par les nanoparticules d'argent n'ont pas été mesurées dans cette étude.

Études *in vivo*

Les études sur les fonctions de reproduction restent peu nombreuses. L'administration de nanoparticules d'argent résulte en :

⁵⁶ Couche de cellules qui participera à la formation du placenta.

- une diminution du nombre de follicules secondaires dans les ovaires de rats Wistar femelles injectées en IP pendant 4 semaines avec 1 et 10 µg/ml de nanoparticules d'argent (Ghorbanzadeh, Moshtaghian *et al.* 2012) ;
- une diminution du nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme chez les rats traités avec 5 mg/kg de nanoparticules d'argent 20 nm en IV. Même si aucune altération morphologique des tubes séminifères n'est observée, l'aire, la circonférence, le diamètre ainsi que l'espace intercellulaire et la vacuolisation de l'épithélium germinal sont augmentés 28 jours après injection de 5 et 10 mg/kg de nanoparticules d'argent de 20 nm. Enfin, si la fréquence de spermatozoïdes anormaux n'est pas modifiée par le traitement aux nanoparticules d'argent, une augmentation du nombre de spermatozoïdes présentant des anomalies est observée 1 et 4 semaines après l'injection. Seul ce dernier effet est observé avec un traitement de 5 mg/kg avec des nanoparticules d'argent de 200 nm (Gromadzka-Ostrowska, Dziendzikowska *et al.* 2012).

Par contre, l'administration orale de 62,5, 125 et 250 mg/kg à des rats de citrate-nanoparticules d'argent (7,9 nm) pendant 42 jours aux mâles et 52 jours aux femelles (2 semaines avant l'accouplement puis tout le long de la gestation et pendant 4 jours de lactation) ne provoque pas d'effets sur de nombreux paramètres de la reproduction (Hong, Kim *et al.* 2014).

Des rats tout juste sevrés ayant reçu 15 ou 30 µg/kg de nanoparticules d'argent de 60 nm par gavage pendant leur période pré-pubertaire montrent un retard de leur puberté (de 3 jours environ). L'exposition pré-pubertaire engendre également au niveau du sperme une réduction de l'intégrité de l'acrosome et de la membrane plasmique ainsi que de l'activité mitochondriale. De plus, une augmentation des anomalies des cellules spermatiques est également observée. Il n'y a cependant pas d'effet sur le comportement sexuel ni sur les concentrations en hormones FSH (hormone folliculo-stimulante), LH (hormone lutéinisante) et testostérone sériques (Mathias, Romano *et al.* 2014).

Quelques études de tératogenèse ont été publiées récemment. L'administration par gavage (jusqu'à 1 000 mg/kg pendant 1 ou 13 jours de gestation) ne montre pas de toxicité maternelle ni d'effet sur le poids corporel, sur la consommation de nourriture ou sur le comportement (Philbrook, Winn *et al.* 2011; Yu, Son *et al.* 2013). De plus, aucun effet sur les taux de grossesse, quel que soit le niveau de dose, n'est observé ; seule une augmentation du taux de perte des pré-implantations pour la plus forte dose (1 000 mg/kg) est signalée (Yu, Son *et al.* 2013). Chez les femelles gestantes, aucun effet sur les divers paramètres biochimiques sériques n'est détecté, même si un effet stress oxydant est détecté au niveau hépatique, uniquement avec la plus forte dose de traitement de 1 000 mg/kg (Yu, Son, *et al.* 2013).

De même, les poids et longueurs moyennes des fœtus et le nombre d'altérations externes, squelettique et viscérale ne diffèrent pas des contrôles (Philbrook, Winn *et al.* 2011; Yu, Son *et al.* 2013). Pourtant, Philbrook *et al.* montrent un impact négatif sur le développement fœtal chez le rat avec une viabilité affectée seulement à la plus faible dose (10 mg/kg) de traitement. L'étude de Yu *et al.* (2013) montre, à l'autopsie, une augmentation du poids du cerveau dans tous les groupes traités (1 000, 300 et 100 mg/kg), mais elle n'est pas dose-dépendante.

Une administration orale d'une durée de 42 jours aux mâles 52 jours aux femelles (2 semaines avant l'accouplement puis tout le long de la gestation et pendant 4 jours de lactation) de 62,5, 125 et 250 mg/kg à des rats de citrate-nanoparticules d'argent (7,9 nm) ne montre pas non plus d'effets sur de nombreux paramètres de tératogenèse (Hong, Kim *et al.* 2014). Cependant, les embryons accumulent de l'Ag dans le foie, les reins, les poumons et le cerveau, suggérant un transfert *via* le placenta et éventuellement le lait. Au niveau du foie, des nanoparticules d'argent ont été observées dans les hépatocytes des embryons par MET (Lee, Choi *et al.* 2012). De manière similaire, Philbrook *et al.* (Philbrook, Winn *et al.* 2011) avaient aussi observé par MET la présence de nanoparticules d'argent de 150 nm dans le foie et les reins des fœtus.

Des résultats similaires ont été obtenus après injection IV à des souris femelles gestantes de 0,4 et 0,73 mg Ag / kg / j pendant 3 jours (jours de gestation : 7, 8 et 9). Ainsi, aucune augmentation des anomalies morphologiques des embryons n'a été observée à la suite du traitement avec les nanoparticules d'argent. De même, l'observation histologique des organes des mères (cerveau, cœur, foie, reins, poumons, rate, endomètre, sac vitellin, placenta) et des embryons ne révèle

aucun effet. Cependant, dans le sac vitellin où de fortes concentrations d'Ag sont décelées, des particules individuelles et des agrégats d'Ag de 30 à 50 nm sont observés dans des vésicules de l'endoderme mais aucune particule à l'extérieur de ces vésicules ou dans la couche mésodermique n'est détectée (Austin, Umbreit *et al.* 2012).

7.2.4.5 Neurotoxicité

In vitro

Sur un système acellulaire *in vitro*, les nanoparticules d'argent inhibent les activités cholinestérasiques (AChE et BChE) (Šinko, Vinković Vrček *et al.* 2013).

Un traitement pendant 4 h avec des PVP-nanoparticules d'argent de 75 (+/- 20 nm) à 10, 30 et 100 µM sur des astrocytes primaires de rats ne provoque pas d'effets sur la cytotoxicité, ni sur le pool de GSH, ni directement, ni après lavage et observation pendant les 7 jours suivants. Par contre, une accumulation dose dépendante d'Ag dans les cellules est observée sans diminution du contenu après 7 jours de récupération. Mais une augmentation du contenu en métallothionéines (protéines riches en groupements thiols piégeant certains ions métalliques) est notée entre 3 et 7 jours après l'exposition (Luther, Schmidt *et al.* 2012).

Avec des nanoparticules d'argent stabilisées par des peptides, Haase *et al.* (Haase, Rott *et al.* 2012) montrent que les nanoparticules d'argent de petite taille (20 nm) sont plus toxiques que les plus grosses (40 nm) sur des cultures mixtes neurones/astrocytes. À 24 h de traitement, les nanoparticules d'argent affectent les astrocytes aux plus faibles concentrations (10 µg/ml) tandis que les neurones ne sont affectés qu'à 20 µg/ml. Les astrocytes incorporent aisément les nanoparticules d'argent, plus probablement dans les lysosomes, les autres compartiments tels que les mitochondries, les noyaux et le RE n'en contenant pas. Par contre, les neurones contiennent rarement des nanoparticules d'argent.

Le traitement de cellules corticales de rat pendant 3 jours à 1, 5, 10 et 50 µg/ml avec des nanoparticules d'argent (Nanocomposix) provoque une toxicité avec inhibition de la croissance des neurites et dégénérescence de processus neuronaux impliquant des altérations du cytosquelette (actine et microtubules). Des modifications des protéines pré- et post-synaptiques ainsi que des perturbations du fonctionnement des mitochondries sont également rapportées (Xu, Pieltz *et al.* 2013).

Récemment, Söderstjerna *et al.* (2013) ont montré que des nanoparticules d'argent de 20 et 80 nm peuvent être internalisées par des cellules embryonnaires humaines précurseurs de neurones en culture dans des conditions de prolifération après 2 semaines d'exposition à 50 et 800 particules/cellule. Elles provoquent une augmentation de la prolifération cellulaire (Ki67) et de l'apoptose (test TUNEL).

In vivo

Peu d'études se sont intéressées aux effets potentiellement neurotoxiques des nanoparticules d'argent.

Les études réalisées sur des rongeurs avec un traitement répété avec des nanoparticules d'argent montrent des divergences dans les résultats obtenus :

- 24 h après la dernière administration IP aux rats de 50 mg/kg de nanoparticules d'argent de 50 à 60 nm ne provoquent pas d'effet sur les fonctions cognitives, mais quelques altérations sur le comportement moteur sont notées (Sharma and Sharma 2012) ;
- par traitement IP pendant 7 jours, avec des nanoparticules d'argent non-revêtues de 25 nm à des doses de 10, 25 et 50 mg/kg, aucune altération des performances de la mémoire ni de la localisation spatiale de souris mâles n'est rapportée (Liu, Huang *et al.* 2013) ;
- l'exposition des rats mâles Wistar traités par voie intra nasale pendant 14 jours tous les 2 jours avec des nanoparticules d'argent non revêtues de 244,5 nm à 3 et 30 mg/kg, modifie des indicateurs de l'apprentissage et de la mémoire. Au niveau de l'hippocampe,

l'induction de stress oxydant et des altérations des neurones pyramidaux sont également rapportés avec œdème et rétrécissement du noyau (Liu, Guan *et al.* 2012) ;

- Avec des nanoparticules d'argent de 23 et 29 nm à 5 et 10 µg/kg, des effets sur la mémoire des rats à court terme mais pas sur celle à long terme sont décrits (Hritcu, Stefan *et al.* 2011) ;
- suite à l'administration orale de nanoparticules d'argent de 14 nm pendant 28 jours à 2,25 mg/kg, des altérations des concentrations en dopamine, noradrénaline et 5-HT dans le cerveau (Hadrup, Lam *et al.* 2012).

L'administration systémique aiguë (IP 50 mg/kg, IV 30 mg/kg, intracarotide 2,5 mg/kg) ou intracérébroventriculaire (20 µg dans 10 µl) de nanoparticules d'argent de 50 à 60 nm altère la perméabilité sang/cerveau et induit de l'œdème 4 et 24 h après administration (Sharma and Sharma 2012). Ces effets sont plus prononcés chez la souris que chez le rat. Des modifications cellulaires sont également répertoriées avec perte de fibres à myéline dans le cerveau et la moelle épinière des animaux traités, altérations morphologiques des cellules nerveuses, surtout dans l'hippocampe, et des cellules gliales, dommages ultra-structuraux dans les neurones, les cellules gliales, les cellules endothéliales et les axones. Cependant, certains effets ne sont pas observés après administration IP (Sharma and Sharma 2012).

L'injection IP de nanoparticules d'argent de 50 à 60 nm à 50 mg/kg, 1 fois/jour pendant 7 jours à des rats, provoque des altérations de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Lafuente, Sharma *et al.* 2012) et de la barrière sang/moelle épinière (Menon, Muresanu *et al.* 2012). Dans ces conditions, malgré une accumulation d'Ag dans l'hippocampe des cerveaux de souris, ni la prolifération des progéniteurs de l'hippocampe ni la neurogenèse de l'hippocampe ne sont altérées (Liu, Huang *et al.* 2013).

7.2.5 Toxicité humaine

Bien que présentant de nombreuses faiblesses, la seule étude réalisée chez l'homme mérite d'être rapportée (Munger, Radwanski *et al.* 2014). Pour cette étude, 62 volontaires sains ont reçu des nanoparticules d'argent commerciales par voie orale pour des durées allant de 3 à 14 jours et à des doses de 100 à 480 µg/jour. Une caractérisation insuffisante des nanoparticules administrées indiquait toutefois que plus de 80 % de l'Ag était sous forme ionique. Des dosages n'ont pas permis de détecter la présence d'Ag dans les urines, alors qu'il était détectable dans le sérum de 92 % des patients exposés pendant 14 jours aux doses les plus importantes, mais seulement chez 42 % des personnes recevant la dose la plus faible. Ces données suggèrent, comme pour le cas des études expérimentales chez l'animal, une élimination rapide par voie fécale (non vérifié dans la présente étude). Bien que non précisées dans la publication, un calcul approximatif permet d'évaluer la dose sérique d'Ag à moins de 1 % de la quantité administrée. Les évaluations du métabolisme et les observations cliniques ne rapportent aucune toxicité (à l'exception d'une légère modification du nombre de pulsations cardiaques).

7.2.6 Synthèse et recommandations

Comportement / Distribution

Dans le rapport de l'Anses publié en mars 2010, une pénétration trans-cutanée de nanoparticules d'Ag sur des modèles *ex vivo* avait été reportée et qualifiée de minime. Depuis, des progrès très nets ont été accomplis. Des études de passage transcutané ont été réalisées sur des explants de peau saine humaine et confirment les résultats d'une pénétration peu profonde. En revanche, des études sur peau saine et lésée chez le rongeur sont contradictoires et ne permettent pas de conclure sur un éventuel passage.

Avant 2010, l'internalisation cellulaire était peu étudiée et les études de biocinétique selon différentes voies d'administration étaient insuffisantes pour tirer des conclusions. Des études plus récentes ont montré une pénétration cellulaire selon différentes voies, influencée par la taille des particules mais également par leurs propriétés de surface.

De même, *in vivo*, la biodistribution, la rétention et l'excrétion des nanoparticules d'argent sont conditionnés par les caractéristiques physico-chimiques de ces dernières. Toutefois, les données contradictoires de la littérature ne permettent pas de conclure sur le ou les paramètres conditionnant une rétention plus importante. De nombreux biais expérimentaux persistent, notamment concernant les quantités administrées non réalistes qui peuvent induire des modifications physiologiques importantes, et les propriétés de dissolution qui restent trop rarement évaluées.

En résumé, les études de biocinétique ne sont pour l'instant qu'exceptionnellement réellement informatives.

Bien que les données *in vivo* et *in vitro* suggèrent que seule une très faible proportion de l'Ag administré traverse les barrières physiologiques, une accumulation à long terme dans les organes secondaires est observée et ne doit pas être négligée (principalement cerveau et embryons). L'absence de description de la forme sous laquelle l'Ag est retrouvé dans les tissus représente également une faille importante dans les études, ce paramètre influençant la clairance à partir des tissus.

Toxicologie générale

Plusieurs études rapportent que la toxicité des nanoparticules d'argent dépend de leur taille, de leur revêtement de surface ainsi que de leur capacité de dissolution en ions Ag^+ . La libération d'ions Ag^+ libres peut contribuer, en partie seulement, aux effets toxiques observés avec les nanoparticules d'argent.

La taille des nanoparticules d'argent influe sur leur processus d'internalisation cellulaire.

La présence d'un enrobage semble affecter l'affinité des nanoparticules d'argent pour la surface cellulaire ainsi que leurs propriétés de dissolution et de relargage d'ions Ag^+ . La nature du revêtement des nanoparticules d'argent influe également sur la toxicité.

La solubilité des nanoparticules d'argent est dépendante de la dose mais également de leur taille et de la nature de l'environnement. Les nanoparticules d'argent de plus petite taille libèrent des quantités plus importantes d'ions Ag^+ impactant alors le niveau de cytotoxicité. La dose intracellulaire d'ions Ag^+ est plus élevée quand les cellules sont exposées aux nanoparticules d'argent comparativement aux formes ioniques sous forme de sels d' AgNO_3 .

À ce jour, le mécanisme de toxicité mis en jeu par les nanoparticules d'argent n'est toujours pas élucidé. Il reste aujourd'hui difficile de distinguer si les effets toxiques observés sont provoqués par la présence d'argent sous forme ionique (Ag^+ dissous) et/ou sous forme de nanoparticule (nanoparticules d'argent).

Toxicité *in vitro*

Le niveau de cytotoxicité induit par les nanoparticules d'argent dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels la taille et la présence ou non d'un revêtement. Les résultats obtenus *in vitro* indiquent que la mort cellulaire (nécrose et apoptose) est principalement due à une augmentation dose-dépendante de nanoparticules d'argent et confirment que la cytotoxicité des nanoparticules d'argent est liée également à la concentration en ions Ag^+ , qui sont à l'origine de la production d'ERO.

Il est intéressant de noter que le milieu de culture des cellules peut directement impacter le niveau de cytotoxicité en fonction de sa composition et surtout de la présence et de la quantité de protéines

Toxicité *in vivo* aiguë et sub-chronique

De manière générale, il faut noter que les effets rapportés ne suivent pas une courbe dose réponse. De plus, les doses utilisées et les périodes d'observation après administration diffèrent d'une étude à l'autre et peuvent, en plus des caractéristiques des nanoparticules d'argent, expliquer la variabilité des réponses observées.

Des essais menés chez le poulet nourri avec des aliments ou de l'eau contenant des nanoparticules d'argent soulèvent la problématique de l'utilisation des nanoparticules d'argent dans l'alimentation animale et du risque potentiel d'exposition humaine lors de la consommation de ces animaux. Ces études méritent d'être répliquées par des études plus robustes méthodologiquement, compte tenu de l'exposition potentielle humaine. Dans le domaine de la médecine, des études concernent l'utilisation de pansements contenant des nanoparticules d'argent. Cependant, elles évaluent principalement les propriétés cicatrisantes et anti infectieuses des nanoparticules d'argent et ne s'attachent pas (ou peu) à en montrer les effets nocifs potentiels. Aucun essai de cancérogenèse standard n'a été réalisé sur des nanoparticules d'argent. En revanche, quelques études ont démontré un éventuel potentiel anti-angiogène ou anti-tumoral.

Les données de la littérature scientifique ne permettent pas de faire actuellement une comparaison des résultats des tests *in vitro* et *in vivo*. De même, la comparaison des études *in vitro* entre elles ou *in vivo* entre elles reste très difficile. Cela s'explique principalement par une connaissance lacunaire concernant les caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux dans le milieu d'exposition ou dans les tissus exposés, les conditions d'exposition elles-mêmes, ou l'inhomogénéité des métriques utilisées.

Génotoxicité

Il est aujourd'hui reconnu que l'origine des lignées cellulaires utilisées peut directement impacter la nature de la réponse mutagène et/ou génotoxique, en fournissant des résultats faussement positifs. Cependant, il apparaît préférable d'utiliser des cellules d'origine humaine, proficiente P53, stable sur le plan caryotypique et muni de systèmes antioxydant efficaces. Dans le cas d'organes primo-exposés, l'utilisation de fibroblastes est discutable et il apparaît préférable d'utiliser des cellules épithéliales, formant des jonctions serrées, paramètre sans doute très important pour les études de suspensions de nanoparticules d'argent *in vitro*. Dans tous les cas, le choix du type cellulaire devrait être clairement justifié.

Par ailleurs, la majeure partie des études publiées *in vitro* utilise des concentrations élevées (jusqu'à 200 µg/mL). Ces niveaux peuvent être considérés comme excessifs et irréalistes pour des suspensions nanoparticulaires.

Les études utilisent également divers temps continus de traitement qui peuvent être considérés comme relativement longs (de 24 à 72 h), en particulier pour le test des comètes. Ainsi, concernant précisément les tests mettant en évidence des altérations primaires de l'ADN *in vitro* (test des comètes), la pertinence des résultats positifs dans ces conditions expérimentales reste très discutable.

Les tests d'aberrations chromosomiques *in vitro* (test du micronoyau et analyse de métaphases) montrent, en fonction des conditions expérimentales, des résultats faiblement positifs ou négatifs. Ainsi, une conclusion définitive quant au potentiel d'induction d'aberrations chromosomiques par des suspensions de nanoparticules d'argent est impossible à fournir.

Enfin, concernant les tests de mutation génique *in vitro*, l'utilisation de systèmes bactériens (ex. test d'Ames) n'est pas recommandée. Les résultats négatifs dans ces tests n'apparaissent pas pertinents. Parallèlement, les tests de mutation génique validés sur cellules de mammifères sont effectués sur des modèles cellulaires d'origine murine transformées (L5178Y, V79,...), ce qui remet en cause leur prédictivité vis-à-vis des expérimentations *in vivo*. Concernant les études *in vivo*, les protocoles expérimentaux mis en œuvre sont également très divers sur le plan de l'espèce animale, de l'organe étudié, de la voie d'exposition choisie, du paramètre mesuré, etc.

Les résultats récents des études utilisant le test des comètes *in vivo* sont contradictoires et montrent qu'il est à ce jour impossible d'attribuer l'origine d'un résultat positif à un paramètre physico-chimique des nanoparticules d'argent précis ni-même de garantir que cet effet soit avéré.

De plus, le test des comètes apparaît inapproprié pour l'évaluation de la génotoxicité au niveau des cellules germinales matures.

Les études disponibles sur la génotoxicité *in vivo* des nanoparticules d'argent sont trop peu nombreuses et concernent des nanoparticules d'argent de caractéristiques physico-chimiques

variables. Il n'est donc pas possible de conclure quant à un danger génotoxique *in vivo* des nanoparticules d'argent. D'autres études, de préférence utilisant une voie d'exposition représentative d'une exposition humaine possible, sont nécessaires pour déterminer si les nanoparticules d'argent peuvent présenter un danger génotoxique *in vivo*.

Différents mécanismes d'action peuvent être responsables de l'effet génotoxique de nanoparticules d'argent, tels que :

- la libération d'ions Ag⁺ à partir des particules dans le milieu de culture ;
- l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), due à la pénétration des particules à travers la membrane cellulaire ;
- la surface des nanoparticules d'argent chargée positivement permettant l'interaction avec l'ADN chargé négativement.

Toxicités spécifiques

Inflammation

Dans les études *in vitro*, il semblerait qu'en fonction des cellules, des conditions de traitement et des caractéristiques des nanoparticules d'argent, seuls certains médiateurs soient induits et pas d'autres ; une inflammation est parfois observée.

Dans les études *in vivo*, une réponse inflammatoire a été observée dans le liquide broncho-alvéolaire même si peu d'effets sur la production de cytokines ont été observés au niveau de l'intestin, du poumon et du foie.

Immunotoxicité

Le peu d'études recensées ne permet pas de conclure sur un effet immunotoxique des nanoparticules d'argent.

Coagulation

Quelques effets sur la coagulation ont été rapportés.

Tératogenèse / toxicité pour la reproduction

Peu d'études sont encore disponibles sur les effets des nanoparticules d'argent sur les fonctions de reproduction et sur la tératogenèse. Les études sur les fonctions de reproduction restent peu nombreuses.

Neurotoxicité

Il est important de procéder à de nouvelles études de neurotoxicité. En effet, les quelques publications sur la thématique sont contradictoires. Des effets sur le système nerveux central, et notamment sur le comportement des animaux, sont toutefois rapportés et se doivent d'être confirmés, car à l'heure actuelle, aucune conclusion définitive ne peut être tirée.

Toxicité humaine

Une unique étude réalisée chez l'homme, bien que présentant de nombreuses faiblesses, mérite d'être rapportée. Les évaluations du métabolisme et les observations cliniques ne rapportent aucune toxicité (à l'exception d'une légère modification du nombre de pulsations cardiaques).

7.3 Études écotoxicologiques

La plupart des études sur l'écotoxicité des nanoparticules recensées dans le rapport de l'Anses publié en 2010 ont été conduites en utilisant des nanoparticules de synthèse et non issues du produit fini considéré. De plus, les concentrations mises en œuvre sont en général 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 considérées 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.

Depuis cet exercice, un nombre croissant d'études scientifiques traitant de problèmes écotoxicologiques des nanoparticules d'argent et essayant de comprendre leurs mécanismes d'actions par rapport à celui des ions argent a été publié.

Les travaux visant à évaluer la bioaccumulation, l'interaction et la toxicité des nanoparticules d'argent avec le *biota*⁵⁷ ont été comparés, dans la majorité des cas, à des particules de plus grande taille (micron) ou à de l'Ag sous forme ionique (AgNO_3). Néanmoins, pratiquement aucun de ces travaux n'a associé aux effets étudiés l'évolution de la spéciation, phénomène complexe car dépendant de la salinité, des interactions avec les molécules biologiques et organiques donneuses d'électrons. Il est presque impossible dans ces conditions de donner un bilan fiable sur les effets des nanoparticules d'argent au plan écotoxicologique. De plus, peu d'études sont faites à des concentrations que l'on pourrait retrouver dans les milieux naturels (eau et sédiments).

7.3.1 Bioaccumulation des nanoparticules dans les organismes

La bioaccumulation des nanoparticules d'argent est un processus important dans l'évaluation des risques puisqu'elle représente un paramètre de l'exposition. Les nanoparticules d'argent ne sont pas une exception à cette généralisation. La bioaccumulation constitue une voie directe pour évaluer les processus qui influencent la biodisponibilité, dans la mesure où cette dernière est définie par la concentration d'un polluant qu'un organisme prélève dans son environnement (*via* la nourriture ou son milieu). La principale question de la bioaccumulation et de la biodisponibilité est de savoir si la nanoparticule d'argent pénètre dans l'organisme ou si elle est adsorbée à la surface externe où elle peut induire des dommages. Certains organismes (plantes, bactéries, champignons) sont entourés de parois cellulaires qui sont semi-perméables et les molécules de petite taille peuvent passer au travers de ces parois cellulaires. Les nanoparticules d'argent et leurs agrégats/agglomérats peuvent passer au travers de la paroi cellulaire et atteindre la membrane plasmique.

Le problème majeur concernant la bioaccumulation des nanoparticules est de savoir si elles sont adsorbées sur l'épiderme des organismes ou véritablement incluses dans les cellules et sous quelle forme elles pénètrent dans l'organisme (Fabrega, Luoma *et al.* 2011b). Les mesures classiques de métaux ne permettent pas de vérifier la forme (ionique ou nanoparticulaire) des nanoparticules intégrées et ne peuvent indiquer leur localisation précise dans les organes. Pour obtenir plus d'informations concernant la bioaccumulation et la localisation des nanoparticules, il est nécessaire d'utiliser des techniques de microscopie.

Chez les poissons (*Zebrafish embryos*), Lee *et al.* (Lee, Nallathamby *et al.* 2007) ont montré par microscopie électronique à transmission (MET) que les nanoparticules de citrate d'argent passaient au travers des pores du chorion dont la spéciation a été élucidée récemment (Auffan, Matson *et al.* 2013). Cette étude montre sur des embryons de Killifish de l'Atlantique que l'Ag métallique (Ag^0) ne traverse pas le chorion pour des concentrations en sel de 10 % par rapport au milieu marin, et que seul l'argent ionique venant de AgNO_3 traversait le chorion pour atteindre une quantité de 25 ng par poisson pour une concentration (Ag^+) initiale de 100 $\mu\text{g/L}$. Dans l'embryon, 100 % de l' Ag^+ est sous la forme Ag_2S , alors que dans le chorion 70 % de l' Ag^+ est complexé avec le soufre et 30 % a été réduit en Ag^0 . Ces données ont été obtenues en utilisant la spectroscopie d'absorption X (XANES), seule méthode permettant d'analyser la spéciation de l'Ag dans les divers organes.

García-Alonso *et al.* (2011) ont décrit la présence de nanoparticules d'argent dans la lumière du tube digestif du ver *Nereis diversicolor* mais également de particules internalisées dans les cellules de l'épithélium digestif. Chez les bactéries (*Pseudomonas*), la pénétration de nanoparticules d'argent au travers de membranes semi-perméables a également été montrée (Fabrega, Renshaw *et al.* 2009; Xu, Brownlow *et al.* 2004).

Chez les animaux supérieurs, l'un des processus permettant l'entrée des nanoparticules dans un organisme au travers des membranes cellulaires est l'endocytose (Moore 2006). Les processus

⁵⁷ *Biota*, ou biote, ensemble des organismes vivants, en écologie.

qui gouvernent la biodisponibilité et donc la bioaccumulation des nanoparticules d'argent sont le résultat d'influences combinées de :

- i. la concentration des nanoparticules d'argent ;
- ii. la spéciation de la nanoparticule et ses caractéristiques physico-chimiques ;
- iii. la nature de l'environnement ;
- iv. la voie d'exposition et
- v. la biologie et l'écologie fonctionnelle de l'organisme considéré.

L'utilisation de modèles biodynamiques est robuste pour décrire la biodisponibilité de nanoparticules. Cependant, des comparaisons systématiques et quantitatives de l'influence de différentes caractéristiques physico-chimiques sur la bioaccumulation de nanoparticules d'argent par les organismes vivants ne sont pas encore disponibles.

Récemment, Khan *et al.* (Khan, Mukherjee *et al.* 2011) ont utilisé un modèle biodynamique pour décrire la biodisponibilité de nanoparticules de citrate d'Ag par comparaison avec de l'Ag sous forme ionique (Ag^+). La prise de l' Ag^+ est deux fois plus importante que celle des nanoparticules d'argent chez le mollusque gastéropode estuarien *Peryngia ulvae*, mais le taux d'élimination de l'Ag sous forme nanoparticulaire est plus rapide. La prise de l'Ag chez *Peryngia ulvae* est moins rapide que celle observée chez un autre mollusque gastéropode d'eau douce (*Lymnaea stagnalis*) dans des conditions expérimentales identiques, suggérant que l'agrégation des nanoparticules en milieu estuarien diminue la biodisponibilité des nanoparticules d'argent. Chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*), l'Ag est significativement plus biodisponible sous forme ionique que sous forme nanoparticulaire, seulement à la plus forte dose testée (6 $\mu\text{g/L}$). L'insuffisance des études actuelles testant l'influence sur la biodisponibilité des propriétés chimiques du milieu expérimental a conduit à des conclusions différentes quant à l'influence de divers processus tels que la dissolution ou l'agrégation.

Par exemple, Gao *et al.* (Gao, Youn *et al.* 2009) ont observé des toxicités plus faibles de nanoparticules d'argent vis-à-vis du zooplancton d'eau douce riche en substances organiques, par comparaison avec des eaux contenant de faibles teneurs en matière organique. Ils ont attribué cela à une réduction du relargage d'ion Ag^+ de la nanoparticule en présence de matière organique.

Cependant, Fabrega *et al.* (Fabrega, Fawcett *et al.* 2009; Fabrega, Renshaw *et al.* 2009) ont montré que la toxicité des nanoparticules d'argent n'était pas simplement fonction de la solubilité de l'Ag mais due aux propriétés intrinsèques des nanoparticules d'argent.

La voie d'exposition doit également être prise en considération. Chez le mollusque bivalve (*Scrobicularia plana*), une bioaccumulation plus importante des nanoparticules d'argent par voie acceuse a été observée par comparaison avec la voie trophique (Buffet, Pan *et al.* 2013).

Un des paramètres importants jouant sur l'exposition est l'hétéroagrégation des nanoparticules avec les colloïdes organiques et minéraux de l'eau. L'argent étant très peu concentré dans les milieux aqueux (Gottschalk, Sonderer *et al.* 2009), il est essentiellement trouvé dans les sédiments, du fait des interactions (adsorption) des nanoparticules avec les colloïdes, ils peuvent jouer un rôle sur la sédimentation de ceux-ci par formation d'agrégats de taille sédimentable. Dans ce cas, le sédiment représente la source majeure de réservoir d'Ag dans les milieux aquatiques. Leur ingestion par des organismes intrasédimentaires est hautement probable.

Cong *et al.* (Cong, Banta *et al.* 2011) ont montré une accumulation d'Ag similaire sous forme soluble et nanoparticulaire chez l'annélide *Nereis diversicolor*. Une expérimentation conduite avec des mésocosmes contaminés par des nanoparticules d'argent (PVP) a montré à la fin de l'exposition, qui a duré 18 mois, que l'Ag restait biodisponible pour les plantes et d'autres organismes aquatiques et intrasédimentaires (Lowry, Espinasse *et al.* 2012).

Un autre aspect qui peut compliquer l'analyse des effets est la spéciation complexe de l'argent. Un travail récent de Levard *et al.*, (Levard, Hotze *et al.* 2012) montre que quelles que soient la taille et la formulation de surface, la dissolution oxydative de nanoparticules d'argent suit la loi de Kelvin. Elle ne dépend que de la taille. La présence d'ions Cl^- ralentit la dissolution par formation de complexe Ag-Cl en surface d' Ag^0 . La précipitation sous forme de particules de Ag_2S diminue

fortement les effets toxiques ($K_s \sim 10^{-50}$). Néanmoins, dans les milieux complexes comme les boues activées des stations d'épuration mais certainement aussi dans l'environnement, la dissolution des particules d'Ag₂S par oxydation du soufre est probable *via* des bactéries oxydantes libérant ainsi Ag⁺.

En conclusion, la compréhension des mécanismes qui gouvernent la biodisponibilité et la bioaccumulation des nanoparticules, notamment celles d'Ag en est à ses prémices. Il apparaît nécessaire de conduire des études sur l'impact du milieu environnemental sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules qui influencent leur biodisponibilité. Les caractéristiques biologiques des différentes espèces ainsi que les différentes voies d'exposition (eau, sols, sédiment, nourriture) doivent être également prises en considération dans l'évaluation des risques écologiques.

7.3.2 Poissons

Des nanoparticules d'argent (10 à 80 nm) affectent les premiers stades de développement (déformation de la moelle épinière, arythmie cardiaque, survie) du poisson zèbre (Asharani, Lian Wu *et al.* 2008; Yeo and Kang 2008). Les nanoparticules d'argent s'accumulent dans les embryons (Asharani, Lianwu *et al.* 2011), les branchies et le foie, affectant la capacité des poissons à lutter contre les faibles niveaux d'oxygène et induisant un stress oxydant (Bilberg, Malte *et al.* 2010; Scown, Santos *et al.* 2010). Toutefois, le seuil à partir duquel les effets apparaissent est variable parmi ces expériences, même au sein des mêmes espèces. Cette variabilité peut être le reflet des différences de conditions expérimentales et/ou dans le comportement des nanoparticules d'argent. En général, les juvéniles de *zebrafish* et le *medaka* japonais semblent plus sensibles aux nanoparticules d'argent qu'à l'AgNO₃.

Certains auteurs suggèrent que la toxicité est seulement attribuable à la dissolution de la nanoparticule d'argent (Chae, Pham *et al.* 2009; Griffitt, Hyndman *et al.* 2009; Kennedy, Hull *et al.* 2010; Yeo and Yoon 2009). D'autres travaux sur des embryons de poissons ou des juvéniles exposés à des concentrations en Ag comprises entre 10 et 20 ng/L et 1 mg/L, soutiennent l'hypothèse de l'existence de mécanismes d'action différents (absorption, réponses transcriptomiques) entre les nanoparticules d'argent et l'Ag⁺ (Asharani, Lian Wu *et al.* 2008; Yeo and Kang 2008; Yeo and Pak 2008). En effet, une prise différentielle dans les formes d'Ag a été montrée chez le poisson zèbre. Chez cette même espèce exposée à des concentrations élevées (0,4 et 100 mg/L), les agrégats de nanoparticules d'argent étaient incorporés dans les vaisseaux sanguins, la peau, le cerveau, le cœur et le vitellus alors que les ions Ag⁺ étaient concentrés seulement dans les organelles, le nucleus et le vitellus (Yeo and Yoon 2009). Chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) exposée pendant 96 h à de l'Ag sous forme nanoparticulaire ou ionique, des modifications significatives de l'expression des gènes ont été observées. Environ 12% des gènes répondaient spécifiquement aux nanoparticules d'argent et 10 % spécifiquement à l'Ag sous forme ionique. Les niveaux de la vitellogénine et des cassures de l'ADN étaient significativement plus faibles chez les animaux exposés aux deux formes d'Ag par comparaison avec les témoins, mais les taux de cassures d'ADN étaient plus faibles chez les poissons exposés aux nanoparticules d'argent, par comparaison à l'Ag ionique. Ces effets génotoxiques des nanoparticules d'argent ne peuvent être expliqués par la présence d'Ag ionique, puisque seulement 1 % d'Ag dissous est libéré par des nanoparticules d'argent. L'exposition des organismes aux nanoparticules d'argent induit spécifiquement les gènes de l'inflammation, alors que l'exposition à l'Ag ionique induit du stress oxydant et de la stabilité protéique (Gagné, André *et al.* 2012).

Une cytotoxicité plus importante des nanoparticules d'argent (35 nm) par comparaison avec des particules d'Ag de plus grande taille (0,6 à 1,6 µm) vis-à-vis de cultures d'hépatocytes de truite arc en ciel a été observée (Gaiser, Fernandes *et al.* 2009).

Les nanoparticules d'argent (60 nm) induisent une réduction de l'intégrité membranaire et de l'activité métabolique de cellules hépatocytaires (Farkas, Christian *et al.* 2010).

Ces mêmes auteurs ont montré des effets cytotoxiques modérés (intégrité membranaire) de diverses nanoparticules d'argent (citrate, PVP) vis-à-vis de cultures cellulaires branchiales de truite

arc en ciel suggérant que les cellules branchiales seraient moins sensibles à l'exposition à l'Ag que les hépatocytes (Farkas, Christian *et al.* 2011).

7.3.3 Mollusques et crustacés

En tant qu'organismes suspensivores, les mollusques bivalves ont développé des processus d'internalisation cellulaire de nano et de micro-particules (endo-et phagocytose), représentatifs de fonctions physiologiques clés comme la digestion intra-cellulaire et l'immunité cellulaire. Une revue de la littérature (Canesi, Ciacci *et al.* 2012) recommande d'utiliser les mollusques bivalves en tant que groupe zoologique cible pour les études de toxicité des nanoparticules. Les moules et les huîtres capturent et ingèrent plus efficacement les agrégats de nanoparticules par comparaison aux nanoparticules libres (Ward and Kach 2009).

Une génotoxicité plus importante a été observée chez des moules (*Mytilus galloprovincialis*) exposées à de l'Ag (10 µg/L) sous forme ionique par comparaison à celle nanoparticulaire (Gomes, Araújo *et al.* 2013).

Chez cette même espèce, une expression différentielle des protéines a été observée entre les nanoparticules d'argent (*major vault protein and ras partial, paramyosin*) et l'Ag ionique (*putative c1q domain containing protein, actin et α-tubulin*) (Gomes, Pereira *et al.* 2013). Chez le mollusque bivalve *Scrobicularia plana*, une induction de biomarqueurs du stress oxydant (catalase, glutathion S-transférase, superoxyde dismutase) a été observée chez les bivalves exposés aux deux formes d'Ag (nanoparticulaire ou ionique). Cependant, puisqu'aucune réponse différente entre les deux formes d'Ag testées a été trouvée, la dissolution de l'Ag évaluée dans le milieu d'exposition pourrait être responsable de cette toxicité.

Chez les crustacés, le modèle couramment utilisé est la daphnie (*Daphnia magna*). L'influence de la taille des particules, de leur revêtement (PVP, lactate, citrate, sodium dodécylbenzène sulfonate, EDTA) ont généralement montré le rôle essentiel des ions Ag⁺ libérés par les nanoparticules d'argent dans la toxicité (immobilisation, mortalité) observée chez *Daphnia magna* (Allen, Impellitteri *et al.* 2010).

7.3.4 Algues

La toxicité des nanoparticules d'argent a été observée vis-à-vis de diverses espèces d'algues d'eau douce (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*) ou marines (*Thalassiosira weissflogii*, *Thalassiosira pseudonana*, *Ulva lactuca*). (Burchardt, Carvalho *et al.* 2012; McLaughlin and Bonzongo 2012; Miao, Schwehr *et al.* 2009; Navarro, Piccapietra *et al.* 2008; Oukarroum, Bras *et al.* 2012; Turner, Brice *et al.* 2012). Cette toxicité est principalement attribuable à celle des ions Ag⁺ issus de la dissolution de nanoparticules d'argent.

Cette dissolution est d'autant plus importante qu'au départ la taille des nanoparticules d'argent est petite (Ma, Levard *et al.* 2012).

Une toxicité (inhibition de la croissance algale et de la photosynthèse) de nanoparticules d'argent à des concentrations susceptibles d'être retrouvées dans l'environnement a été observée chez la diatomée d'eau douce (*Chlamydomonas reinhardtii*) ou marine (*Thalassiosira weissflogii*) (Miao, Schwehr *et al.* 2009; Navarro, Piccapietra *et al.* 2008). Toutefois, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, les nanoparticules d'argent étaient plus toxiques que les ions Ag⁺, suggérant un effet spécifique « nano » dû à l'interaction de la nanoparticule avec les cellules algales.

Une diminution de la teneur en chlorophylle, de la viabilité des algues et une augmentation de la formation d'ERO et de la peroxydation des lipides a été mise en évidence chez les algues d'eau douce (*Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella vulgaris*) exposées à des nanoparticules d'argent (50 nm) (Oukarroum, Bras *et al.* 2012). Malgré une différence de sensibilité entre les deux espèces, ces dernières présentent des effets toxiques attribuables aux nanoparticules d'argent. Les auteurs insistent sur le rôle essentiel des communautés algales ainsi que sur les dangers que leur perte représenterait vis-à-vis du fonctionnement de l'écosystème aquatique.

7.3.5 Vers

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans* exposé à des nanoparticules d'argent (< 100 nm) à des concentrations de 0,05, 0,1 et 0,5 mg/L pendant 24 à 72 h, une réduction du potentiel reproducteur a été observée. L'analyse génomique montre que l'exposition aux nanoparticules d'argent induit une expression de gènes impliqués dans le stress oxydant, suggérant que la diminution de la capacité reproductrice pouvait être liée à ce stress oxydant (Roh, Sim *et al.* 2009). Des conclusions similaires chez cette même espèce ont été reportées par Lim et Roh (Lim, Roh *et al.* 2012).

Yang *et al.* (2012) ont montré que les nanoparticules les moins solubles (présentant donc un effet nano-spécifique) favorisent la génération d'ERO et créent ainsi un stress oxydant. L'exposition de *C. elegans* à trois types de nanoparticules d'argent enrobées de PVP (21 nm, 72 nm) ou de citrate (7 nm) a montré une ingestion et une internalisation des nanoparticules ainsi qu'une inhibition de la croissance à de fortes concentrations en nanoparticules d'argent (≥ 5 mg/L).

Aucun stress oxydant n'a été observé suite à l'exposition aux nanoparticules d'argent, ce qui peut être expliqué par le rôle protecteur de l'enrobage des nanoparticules, limitant ainsi les réactions d'oxydoréductions (Meyer, Lord *et al.* 2010).

En 2012, Kim *et al.* (Kim, Nam *et al.* 2012) ont exposé des spécimens de *C. elegans* à des nanoparticules d'argent (50,6 nm) enrobées de citrate. Les concentrations d'exposition ont été déterminées à 0-50 mg/L d'ions Ag^+ pour les tests de survie (24 h) et 0 à 10 mg/L d'ions Ag^+ pour les tests de reproduction (48 h). Les résultats ont montré une réduction importante de la survie et de la reproduction des vers jusqu'à 100 et 10 mg/L respectivement. L'exposition a également provoqué des œdèmes épidermiques importants, pouvant être dus à des infections secondaires. Aucune absorption de nanoparticules d'argent n'a été observée, mais une interaction entre les nanoparticules d'argent et les surfaces biologiques de *C. elegans* a été révélée.

Chez le ver de terre *Eisenia fetida* une exposition subchronique (28 jours) à de l'Ag sous forme soluble ou nanoparticulaire (nanoparticules d'argent enrobées de PVP-hydrophile ou OA-amphiphile, 30 à 50 nm) à des concentrations comprises entre 0 et 1 000 mg/kg de sol sec n'a montré aucun effet sur la mortalité ou la croissance des vers, mais une baisse significative de leur reproduction. La bioaccumulation de l'Ag et la toxicité étant plus importante pour l'exposition à la forme soluble qu'à la forme nanoparticulaire. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les deux types de nanoparticules d'argent (PVP-hydrophile ou OA-amphiphile) suggérant que le caractère hydrophile ou non de l'enrobage ne semblerait pas affecter la toxicité des nanoparticules, et donc que cette dernière ne serait pas nano-spécifique mais due à la libération d'ions Ag^+ dans le milieu (Shoults-Wilson, Reinsch *et al.* 2011).

Chez le ver marin intrasédimentaire *Nereis diversicolor* exposé pendant 10 jours à des nanoparticules d'argent (30 nm) enrobées de citrate, des agrégats de nanoparticules d'argent ont été retrouvés dans l'épithélium intestinal. L'absence d'induction de métallothionéine (protéine impliquée dans la détoxification des métaux ioniques) suggère que la forme accumulée dans les cellules était principalement nanoparticulaire par comparaison avec la forme ionique (García-Alonso, Khan *et al.* 2011). Chez cette même espèce exposée à des sédiments contaminés par des nanoparticules d'argent (< 100 nm), les dommages à l'ADN observés étaient significativement supérieurs chez les organismes exposés aux nanoparticules d'argent par comparaison à des particules de taille correspondants à 2 et 3,5 μm . Là aussi, l'effet de la dissolution par rapport à la taille n'a pas été étudié.

7.3.6 Microorganismes

Les micro-organismes constituent un compartiment important dans l'environnement pour leur rôle dans la biodégradation des contaminants et parce qu'ils constituent un vecteur de transfert pour les organismes supérieurs. Une étude récente montre des réponses biologiques caractéristiques d'une toxicité venant de plantes terrestres et des bactéries des sols lorsque des doses de 0,14 mg de nanoparticules d'argent Kg de sols sont ajoutées à des boues (Colman, Arnaout *et al.* 2013).

Kim *et al.* (Kim, Kuk *et al.* 2007) ont montré que les nanoparticules d'argent ont un pouvoir bactéricide dû à la génération d'anions superoxydes à la surface des nanoparticules et/ou des ions

qu'elles libèrent. Les nanoparticules d'argent s'adsorbent à la surface des cellules, et la génération d'ERO peut endommager les membranes cellulaires, perturbant également les échanges d'ions entre la cellule et son milieu. Les altérations membranaires pourraient faciliter l'entrée de nanoparticules d'argent à l'intérieur de la cellule, générant des dommages. L'internalisation des nanoparticules d'argent peut conduire à l'apparition de malformations cellulaires. Ces résultats montrent que les bactéries sont sensibles aux nanoparticules d'argent et que leur accumulation peut avoir des effets préjudiciables sur les microorganismes dans le traitement des eaux usées (Choi, Deng *et al.* 2008).

7.3.7 Mécanismes d'action écotoxique

Les mécanismes d'action peuvent être présentés dans le tableau suivant (Tableau 5). Ils ne peuvent être tous associés aux formes chimiques de l'argent, car peu de chercheurs ont utilisé les bons outils pour la connaître (spectroscopies d'absorption X associés aux synchrotrons). Néanmoins, la forme dissoute Ag^+ en milieu peu salé est certainement la forme toxique. Cette forme varie quand le milieu a une salinité croissante, car les formes AgCl_2^- et AgCl_3^- sont prédominantes. De même, la réduction de la forme dissoute par des composés donneurs d'électrons est tout à fait possible, même si très peu de travaux le montre. Enfin, la dissolution d'argent métallique (Ag^0) est dépendante de la taille et des interactions avec par exemple les ions Cl^- qui la ralentissent.

Tableau 5 : Mécanismes d'action des nanoparticules d'argent

Organismes	Survie-mortalité-croissance	Stress oxydant	Génotoxicité Inflammation	Métabolisme	Expression des gènes ou protéines	Doses et spéciation
Poissons	X	X	X	X	X	10 ng à 100 mg Ag^+ > nanoparticules d'argent
Mollusques et crustacés	X	X	X		X	$\mu\text{g/L}$ Ag^+
Algues	X	X				$\mu\text{g/L}$ - mg/L nanoparticules d'argent et Ag^+
Micro-organismes	X	X				mg/L nanoparticules d'argent et Ag^+
Vers	X	X	X		X	mg/L , mg/Kg sédiment

7.3.8 Synthèse et recommandations

Les études récentes de la littérature montrent que les nanoparticules d'argent sont bioaccumulées et induisent des effets biologiques dans tous les organismes aquatiques et terrestres étudiés aux doses testées. Il est important de signaler que compte tenu du fait que les approches expérimentales employées sont différentes, une comparaison des effets entre les différentes espèces et au sein des mêmes espèces demeure difficile. Toutefois, il semble se dégager comme effets toxiques :

- l'induction d'un stress oxydant chez toutes les espèces étudiées ;
- une inhibition de la croissance algale et de la photosynthèse ;
- des effets génotoxiques chez les mollusques et les vers marins ;
- des effets sur la reproduction chez le ver de terre et le nématode *C. elegans* et des effets tératogènes chez le poisson zèbre ;
- la toxicité aiguë des nanoparticules d'argent est plus élevée chez les crustacés (CL 50 : 0,01 mg/L) et les algues (CL50 : 0,36 mg/L) que chez les poissons (CL 50 : 1,36 g/L), les nématodes (CL 50 : 3,34 mg/L) et les bactéries (CL 50 : 7,10 mg/L) (Bondarenko, Juganson *et al.* 2013) ;
- des effets sur des plantes terrestres et les bactéries des sols (Colman, Arnaout *et al.* 2013) caractérisés par une très forte augmentation de N₂O et une forte baisse des enzymes extracellulaires des bactéries du sol.

De plus, quelques études scientifiques montrent que les nanoparticules d'argent induisent une modification des expressions génique et protéique chez le poisson et la moule.

Les mécanismes d'action toxique des nanoparticules d'argent sont encore largement méconnus, notamment du fait du peu de données disponibles sur le suivi de la spéciation de l'argent, sur la physico-chimie des nanoparticules ainsi que sur les facteurs biotiques et abiotiques déterminant leur comportement dans l'environnement au cours du temps. Bien que tous les auteurs ne soient pas en accord sur ce point, la plupart des études précédemment citées semblent indiquer qu'en milieu peu salé, la toxicité des nanoparticules d'argent serait plutôt liée à la libération des ions argent.

Ainsi, de nombreux paramètres physico-chimiques restent à déterminer afin d'être en mesure d'évaluer de manière fiable les risques environnementaux induits par les nanoparticules d'argent, notamment l'impact du milieu environnemental sur la physico-chimie des nanoparticules d'argent qui influence leur biodisponibilité et leur bioaccumulation, souvent précurseurs de leur toxicité. Les caractéristiques biologiques des différentes espèces ainsi que les différentes voies d'exposition (eau, sols, sédiment, nourriture) doivent être également prises en considération dans l'évaluation des risques écologiques.

8 Conclusions et recommandations du groupe de travail

8.1 Conclusions

➤ Préambule

Le groupe de travail rappelle que la question adressée par la saisine à l'origine de ces travaux porte sur « la mise à jour de l'expertise relative à l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale, pour l'alimentation et pour l'environnement, cas particulier du nano-argent », soit l'argent sous forme nanométrique (nanoparticules d'argent). Cette formulation s'inscrit dans le sillage de la plupart des réglementations en vigueur encore aujourd'hui, dans la mesure où seule la composition chimique est explicitée pour désigner ces nanoparticules à base d'argent. Sous ce vocable « nanoparticules d'argent », on retrouve des nanoparticules qui se distinguent par leur distribution en taille, leur morphologie, leur traitement / fonctionnalisation de surface, notamment.

Des travaux antérieurs, en particulier ceux menés au sein du groupe de travail sur les nanomatériaux manufacturés de l'OCDE (WPMN) ou encore du comité technique « Nanotechnologies » de l'ISO (TC229), démontrent que la réactivité des nanoparticules est fonction d'un ensemble de paramètres physico-chimiques les caractérisant (et pas uniquement de leur composition chimique) et des interactions avec leur environnement.

Ces considérations ont conduit le groupe d'experts à souligner qu'il est impossible d'aboutir à une conclusion unique et généralisable à l'ensemble des nanoparticules d'argent pour ce qui concerne leur identification, l'évaluation de leur dangerosité, leur activité antibactérienne et les possibles phénomènes de bactériorésistance, quelles que soient leurs applications envisagées ou existantes. En effet, l'hétérogénéité des résultats publiés sur tous ces points s'explique en premier lieu par les différences portant sur les caractéristiques physico-chimiques des diverses nanoparticules d'argent étudiées.

Enfin, le GT souligne que l'utilisation de l'argent sous toutes ses formes (ionique, nanoparticulaire, massique...) est revendiquée principalement pour son activité antimicrobienne. Par activité antimicrobienne, il faut comprendre soit un effet inhibiteur de croissance des micro-organismes, soit un effet létal vis-à-vis des micro-organismes, les études sur les bactéries étant les plus souvent citées. Une telle activité a pour effet de conduire à la mort de micro-organismes. En conséquence, l'emploi de l'argent pour ce type d'applications antibactériennes peut entraîner l'apparition de phénomènes de bactériorésistance et avoir un impact négatif sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème. Cette activité antibactérienne et ses possibles conséquences doivent donc être nécessairement prises en compte dans le cadre de l'évaluation des risques liés aux nanoparticules d'argent.

➤ Exposition

L'analyse des risques liés à l'usage des nanoparticules d'argents suppose une évaluation des connaissances disponibles sur les effets induits par ces nanomatériaux sur la santé et sur l'environnement. Cette évaluation doit nécessairement être associée à une évaluation des sources et des conditions d'exposition de l'homme et de l'environnement. En revanche, si la présence de nanoparticules d'argent venait à être attestée sur le marché français, il conviendrait encore de déterminer plus précisément quelles sont les sources d'exposition potentielles des populations (travailleurs, consommateurs, riverains de sites industriels, etc.) et de l'environnement, afin de considérer, non seulement les voies d'exposition humaine aux nanoparticules d'argent les plus probables (voie cutanée, respiratoire ou orale), mais aussi d'estimer les doses auxquelles les

populations concernées et l'environnement seraient concrètement exposées, tout au long du cycle de vie des différents produits contenant des nanoparticules d'argent.

Depuis le 1er janvier 2013, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-5 du Code de l'environnement, est entrée en vigueur la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire fabriquées, importées ou distribuées sur le territoire français. Les éléments d'analyse du bilan de la première année de mise en œuvre de cette obligation de déclaration semblent indiquer que les nanoparticules d'argent ne sont pas fabriquées, importées ou distribuées à des utilisateurs professionnels sur le territoire français en dehors d'une activité de recherche et développement et portant sur une quantité totale <1 kg. D'autres inventaires⁵⁸ mentionnent pourtant leur présence dans des produits de consommation. Cet usage est également rapporté par la consultation des sites internet d'entreprises qui distribuent leurs produits sur le territoire national⁵⁹. En l'absence de sources de données fiables permettant d'évaluer l'exposition, les experts sont contraints, comme cela a été fait dans le rapport de l'ANSES, de 2010, d'estimer cette dernière sur la base de scénarii plus ou moins réalistes et/ou d'extrapoler à partir de cas théoriques. S'ils permettent de mieux comprendre les risques éventuels liés aux nanoparticules d'argent, de tels scénarii ne permettent toutefois pas de les évaluer réellement.

➤ Caractérisation physico-chimique

La lecture des articles scientifiques postérieurs à ceux pris en compte lors du précédent rapport de l'Anses (Anses 2010) permet de constater que la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent utilisées est réalisée aujourd'hui de façon plus systématique et de manière plus pertinente. L'intégration de plusieurs méthodes de mesures, notamment, aboutit à l'obtention de données plus justes, fiables et robustes. Certains articles rapportent également des mesures réalisées afin d'étudier la stabilité temporelle des suspensions, la vitesse de dissolution et la teneur en ions argent (Ag^+) au cours du temps dans des milieux représentatifs des milieux de culture cellulaires des tests *in vitro*. Cependant, trop peu d'études encore s'intéressent aux variations des paramètres physicochimiques des nanoparticules d'argent en présence de cellules ou organismes (tests *in vitro* et *in vivo*).

Des progrès en matière de caractérisation physico-chimique sont donc notés dans la littérature scientifique, mais il subsiste encore des lacunes, notamment concernant les données de dissolution des nanoparticules (et donc sur la teneur en Ag^+ ou encore sur la spéciation de l'argent).

Malgré ces progrès, à l'heure actuelle, la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent dans les sources d'exposition et dans les matrices complexes demeure difficile, voire impossible, en raison :

- du nombre limité de méthodes permettant cette caractérisation ainsi que de la complexité de leur mise en œuvre, non disponibles en routine (exemples : microscopie électronique, mesures synchrotron) ;
- du manque de méthodes de mesures de références et de l'absence dans les études scientifiques d'utilisation de nanomatériaux de référence « nano » certifiés ou non (MRC ou MR) ;
des lacunes dans la connaissance de la stabilité des paramètres physicochimiques (en particulier la dissolution et la spéciation) en fonction du milieu (ions, protéines, dispersants, etc.) et de leurs évolutions dans le temps et des étapes du cycle de vie de ces nanoparticules d'argent.

⁵⁸ Voir chapitre 4 du présent rapport

⁵⁹ Voir chapitre 4 paragraphe 4.2. du présent rapport

➤ Toxicologie - effets sur la santé

Bien que la présence d'argent ait été observée dans différents organes en fonction des voies d'administration, la forme sous laquelle cet argent est présent n'est pas établie. Il n'est pas non plus clairement établi si les effets observés lors de certains tests *in vitro* et *in vivo* sont exclusivement dus aux ions Ag^+ ou à la forme nanoparticulaire, voire à des effets combinés entre les ions Ag^+ et les nanoparticules d'argent.

Les études de biodistribution menées chez le rongeur et le lapin ont permis de mettre en évidence des organes cibles des nanoparticules d'argent. Une accumulation préférentielle dans le foie, la rate, les reins et les poumons est observée, quelle que soit la voie d'administration, avec des niveaux plus élevés chez les femelles que chez les mâles pour les reins.

Des expositions aiguës ou sub-chroniques chez le rongeur et le lapin n'ont globalement entraîné que peu de signes cliniques significatifs et/ou durables ni même d'effets sur le comportement, quelle que soit la voie d'exposition utilisée. Cependant, quelques effets mineurs sont rapportés directement au niveau des organes primo-exposés (poumons, intestin) ou des organes systémiques (foie, rate et reins essentiellement).

Les mécanismes généralement impliqués dans la toxicité et la génotoxicité sont, pour les nanoparticules d'argent, le déséquilibre de la balance oxydo-réduction (stress oxydant) et l'inflammation.

Il faut souligner que, souvent, les effets rapportés ne suivent pas une courbe dose-réponse, ce qui rend délicate l'interprétation des données toxicologiques.

Bien que de nombreux articles récents aient été publiés sur l'évaluation de la toxicité et de la génotoxicité *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules d'argent, les résultats sont pour la plupart contradictoires, ce qui rend l'estimation de la dangerosité de ces nanoparticules encore difficile à ce jour. En l'état, ces contradictions peuvent être expliquées par des différences telles que le type de nanoparticule d'argent (taille, revêtement), le type cellulaire utilisé, l'absorption cellulaire, la dissolution intracellulaire, le paramètre de toxicité étudié, la façon dont les cellules/animaux ont été exposées, etc.

En effet, de nombreuses études utilisent des protocoles non standardisés, non validés (ex : test des comètes sur cellules germinales), des voies d'exposition irréalistes (intra péritonéale, intraveineuse), des doses peu réalistes et des espèces peu (ou pas) extrapolables à l'Homme (ex : drosophile) avec, en conséquence, une probabilité forte d'induire des effets non spécifiques.

Certaines publications relatives à des expérimentations animales (*in vivo*) soulignent, après exposition aux nanoparticules d'argent, le passage d'argent (de forme indéterminée (ionique ou nanoparticules d'argent) à travers les barrières hémato-encéphalique, placentaire, ou encore hémato-testiculaire. Le passage des nanoparticules d'argent à travers ces barrières biologiques n'est donc pas à exclure. Toutefois, ces mécanismes d'actions ne sont pas encore élucidés, notamment par manque d'expérimentations *in vitro* ou *ex vivo*.

Il est néanmoins difficile d'estimer le potentiel reprotoxique et tératogène des nanoparticules d'argent, compte-tenu du peu d'études disponibles sur animaux. Celles-ci suggèrent cependant des effets à différents niveaux de la fonction de reproduction (production de gamètes, puberté, etc.). D'après les études réalisées chez le rongeur, il semble que les nanoparticules d'argent ne provoquent pas d'altérations morphologiques des embryons, mais un effet sur leur implantation et leur viabilité n'est pas à exclure. Par ailleurs, l'accumulation observée d'Ag dans différents organes des fœtus mérite une attention particulière.

Les résultats de neurotoxicité sont très éparés. Compte tenu du passage potentiel des nanoparticules d'argent au travers des barrières hémato-encéphalique et sang/moelle épinière, des effets toxiques au niveau du système nerveux central ne sont donc pas à exclure.

➤ Écotoxicologie

Des avancées en écotoxicologie sont observées depuis 2009 (cf. Anses 2010), concernant aussi bien le nombre de travaux publiés que la qualité de ces études. En particulier, la caractérisation

physico-chimique des nanoparticules d'argent est réalisée de façon plus systématique et plus approfondie, et les études en milieux complexes commencent à se développer par le biais d'études conduites en mésocosme, en milieu naturel ou en laboratoire (eau douce surtout).

Ces études récentes montrent que les nanoparticules d'argent sont bioaccumulées et qu'elles induisent des effets biologiques dans tous les organismes aquatiques et terrestres étudiés. Cependant, de nombreuses interrogations demeurent à propos de la localisation des nanoparticules d'argent dans les organismes (tissus, cellules) et du mécanisme d'action toxique des nanoparticules d'argent, en particulier en ce qui concerne la contribution de la forme ionique ou de la forme nanoparticulaire dans la toxicité. Ces incertitudes sont en partie dues à l'insuffisance des données disponibles sur le devenir et le comportement des nanoparticules d'argent dans l'environnement (influence des facteurs biotiques et abiotiques) au cours du temps. De plus, il existe toujours à l'heure actuelle une méconnaissance sur le transfert trophique des nanoparticules d'argent.

➤ **Activité antibactérienne et résistance**

Les aspects d'activité antibactérienne et de résistance ne faisaient pas l'objet de la saisine du précédent rapport de l'Anses (Anses 2010). Ils ont été abordés dans la présente saisine *via* une analyse bibliographique principalement ciblée sur les données publiées postérieurement à 2009. Le groupe de travail souligne que, concernant les données de la littérature antérieures à 2009, il partage l'analyse de la littérature scientifique publiée par le BfR⁶⁰ concernant les nanoparticules d'argent.

Comme en toxicologie et en écotoxicologie, il faut souligner d'emblée que le défaut de précisions ou d'informations sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent étudiées induit des biais quant à l'interprétation et à la comparaison des résultats des études portant sur l'activité antimicrobienne.

Concernant le mode d'action antibactérien des nanoparticules d'argent, des travaux en laboratoire significatifs ont permis de mettre en évidence une différence d'activité antibactérienne de l'ion argent par rapport à celle des nanoparticules d'argent. Cependant, il convient de souligner l'absence de travaux de recherche ciblés tendant à expliquer la nature de cette différence.

Dans les milieux naturels, la grande complexité et la grande diversité de ces milieux ayant une influence sur la stabilité des différents états de l'argent, il est à ce stade impossible de distinguer la contribution des nanoparticules d'argent de l'ion argent dans cette activité antibactérienne.

La capacité d'adaptation des bactéries à l'ion argent monovalent et les résistances croisées à certains antibiotiques ont été démontrées en laboratoire depuis de nombreuses années. Cependant, il n'est toujours pas possible de formuler des conclusions quant aux risques de propagation de la résistance en conditions réelles. En effet, les études menées en milieux naturels sont encore trop peu nombreuses et aboutissent à des conclusions souvent contradictoires. Les travaux épidémiologiques permettant d'évaluer la prévalence des gènes de résistance à l'argent parmi les populations bactériennes font cruellement défaut.

8.2 Recommandations du groupe de travail

La mise en place de nouveaux outils réglementaires doit contribuer au développement de nouvelles connaissances sur les substances à l'état nanoparticulaire, notamment en introduisant des exigences qui permettent de renseigner des informations nécessaires à l'évaluation des risques, en particulier des nanoparticules d'argent. En effet, ces connaissances demeurent malheureusement aujourd'hui insuffisantes pour évaluer les risques liés aux nanoparticules d'argent et à leurs utilisations.

⁶⁰BfR : *Bundesinstitut für Risikobewertung* - Institut fédéral allemand d'évaluation des risques.

Face à la mise sur le marché croissante de produits intégrant des nanomatériaux et en particulier des nanoparticules d'argent, le GT recommande :

- la poursuite des efforts réglementaires et des efforts de recherches portant sur l'exposition, la caractérisation et la dangerosité des nanoparticules d'argent ;
- la prise en compte du contexte d'incertitude scientifique concernant les risques potentiels associés aux nanoparticules d'argent.

S'appuyant sur les avancées des connaissances, le GT reprend en partie les recommandations exprimées dans le rapport d'expertise de l'Anses de 2010, relatif à l'« évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement ». Ces recommandations sont cependant réévaluées au vu du contexte réglementaire, des avancées scientifiques constatées et des lacunes persistantes.

- **Faire progresser les connaissances sur l'exposition, la caractérisation et la dangerosité potentielle des nanoparticules d'argent (recherche)**

Exposition

Considérant

- l'entrée en vigueur, depuis le 1er janvier 2013, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-8 du Code de l'environnement, de la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire fabriquées, importées ou distribuées sur le territoire français ;
- l'absence de toute déclaration de substances à l'état nanoparticulaire à base d'argent dans l'inventaire obligatoire pour 2013 en France ;
- l'absence d'obligation de déclarer les produits de consommation contenant des nanomatériaux, dont les nanoparticules d'argent qui sont commercialisés sur le territoire national ;
- les lacunes et les difficultés persistantes concernant l'évaluation des expositions de la population générale et des travailleurs, notamment :
 - o la connaissance des sources d'exposition aux nanoparticules d'argent ;
 - o la documentation des incertitudes de mesure ;
 - o les conditions de prélèvement et d'échantillonnage des produits testés ;
 - o les connaissances relatives à la traçabilité de ces produits dans les milieux concernés ;
- les recommandations du rapport d'expertise de l'Anses de 2010 relatif à l'« évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement » ;

le groupe de travail recommande :

- d'entreprendre des travaux visant à comprendre l'absence de déclaration de nanoparticules d'argent en France en 2013 ;
- d'envisager, en conséquence, la révision des modalités de l'obligation de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire afin de pouvoir identifier, évaluer la quantité et déterminer les usages des nanoparticules d'argent produites, importées et distribuées à tous leurs utilisateurs, *a minima* pour le territoire national ;
- d'améliorer ou de développer des méthodes :
 - o de caractérisation des nanoparticules d'argent et de leurs suspensions *in situ* (fluides biologiques, matrices complexes, etc.) ;
 - o de mesure permettant de déterminer les doses réelles auxquelles sont exposés les consommateurs et les personnes exposées en milieu professionnel ;
- de développer et d'utiliser des matériaux de référence pour étalonner les appareils de mesure ;
- de poursuivre et renforcer la documentation sur les émissions et les expositions réelles des travailleurs, des consommateurs et des riverains.

Caractérisation physicochimique

Considérant :

- que la réactivité des nanoparticules d'argent dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques ;
- que les paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent ne sont pas nécessairement tous des paramètres intrinsèques des nanoparticules, mais sont dépendants du milieu d'exposition ainsi que du cycle de vie des nanoparticules d'argent ;
- les recommandations du rapport d'expertise de l'Anses de 2010 relatif à l'« évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement » ;

le GT recommande :

- de recourir systématiquement à une combinaison de plusieurs méthodes de caractérisation physico-chimique afin d'obtenir une connaissance aussi complète et fiable que possible des propriétés physico-chimiques des nanoparticules d'argent auxquelles sont exposés la population générale ou salariée ainsi que l'environnement ;
- de caractériser les nanoparticules d'argent dans les modèles utilisés pour les tests (éco)toxicologiques afin de comprendre le devenir et le comportement des nanoparticules d'argent diffusées dans l'environnement ;
- d'apporter une attention particulière à la stabilité ou l'évolution de ces paramètres physico-chimiques dans les milieux réels d'exposition (en présence ou en l'absence des cellules lors des tests *in vitro*, ou en présence d'organismes lors des études d'écotoxicologie notamment) ;
- d'utiliser des nanomatériaux de référence pour étalonner les appareils de mesures ;
- de rechercher des protocoles d'échantillonnage de référence afin de pouvoir comparer les études entre elles ;
- d'utiliser, de manière systématique, des méthodes de caractérisation de la dissolution des nanoparticules d'argent (et de la spéciation éventuelle) dans les études afin de progresser dans la compréhension des mécanismes d'action des nanoparticules d'argent par rapport aux ions Ag^+ .

Toxicologie

Considérant

- le nombre élevé de publications scientifiques postérieures au précédent rapport publié en 2010 ;
- l'hétérogénéité des résultats publiés ;
- le fait que la réactivité des nanoparticules d'argent dépend notamment de leur environnement (cellule, polymère, dispersants, ions, *etc.*) ;
- la possibilité d'un franchissement des barrières physiologiques ;
- la possibilité de bioaccumulation dans des organes cibles ;
- la possibilité de formation d'espèces réactives de l'oxygène pouvant provoquer des effets toxiques (cytotoxicité, génotoxicité, inflammation, apoptose, nécrose) ;
- l'impossibilité de statuer, en l'état actuel des connaissances, sur les effets reprotoxiques, neurotoxiques et génotoxiques des nanoparticules d'argent ;
- l'unique étude de toxicologie réalisée chez l'homme, présentant de nombreuses faiblesses (Munger *et al.*, 2014) ;
- les recommandations du rapport d'expertise de l'Anses de 2010 relatif à l'« évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement » ;

le GT recommande :

- de procéder à une caractérisation physico-chimique complète et systématique (avant et au cours des tests) et de développer des travaux portant sur l'étude des modifications de la suspension de nanoparticules d'argent une fois introduites dans un milieu complexe ou un organisme ;
- de réaliser des études de toxicocinétique complétées par des mesures d'excrétion des nanoparticules d'argent, qui font actuellement défaut, et qui devraient être réalisées préalablement à toute étude *in vitro* ou *in vivo*⁶¹ ;
- de renseigner systématiquement le protocole des expérimentations et de détailler leur mise en œuvre :
 - o en sélectionnant le modèle cellulaire ou l'espèce animale, le(s) paramètre(s) étudiés afin d'être prédictif ;
 - o en s'assurant de la pertinence des doses et des temps de traitement utilisés afin d'éviter d'engendrer des résultats non spécifiques, peu ou non prédictifs d'une activité *in vivo*, les rendant finalement inutilisables pour caractériser les dangers ;
 - o en utilisant de préférence une voie d'exposition représentative d'une exposition humaine possible *in vivo* ;
 - o en évaluant différents événements génétiques pouvant mener à des phénomènes génotoxiques et/ou mutagènes tout en s'affranchissant d'éventuelles interférences dans les tests (colorants, réactifs, etc.) ;
 - o en comparant les effets générés avec ceux produits par les ions Ag⁺ ;
- d'évaluer l'influence des paramètres physico-chimiques des nanoparticules d'argent telles que la taille ou la dissolution des nanoparticules d'argent sur leur durée de rétention et leur clairance ;
- de poursuivre les études de toxicité en général, en insistant sur les études chroniques et sub-chroniques ;
- de développer des méthodes de référence pour pouvoir évaluer la dangerosité des nanoparticules d'argent liée à leurs usages ;
- d'approfondir les études concernant les franchissements de barrières biologiques (peau, placenta, hémato-encéphalique, etc.) ;
- de rechercher des effets de neurotoxicité et reprotoxicité, compte tenu notamment du danger potentiel de la présence d'Ag (quelle que soit sa forme) sur le système nerveux central ou les organes de la reproduction ;

Écotoxicologie

Considérant :

- le nombre élevé de publications scientifiques postérieures au précédent rapport de 2010 ;
- l'hétérogénéité des résultats travaux notamment en ce qui concerne les approches expérimentales ;
- la dépendance de la réactivité des nanoparticules d'argent vis-à-vis de leur environnement (cellule, polymère, dispersants, ions, etc.) ;
- les résultats sur la biodisponibilité et la bioaccumulation des nanoparticules d'argent ;
- les effets biologiques constatés chez tous les organismes aquatiques et terrestres étudiés aux doses testées ;
- les recommandations du rapport d'expertise de l'Anses de 2010 relatif à l'« évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement » ;

⁶¹ Les résultats de toxicocinétique obtenus permettent de définir les organes cibles, les lignées cellulaires pertinentes et les doses.

Le groupe de travail recommande :

- de poursuivre des études d'écotoxicologie, en milieux complexes notamment, afin de prendre en compte l'impact du milieu environnemental sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent et sur leur spéciation ;
- de conduire des études dans des conditions réalistes d'un point de vue environnemental (e.g. doses et durée d'exposition) ;
- de poursuivre les études visant à localiser les nanoparticules d'argent dans les organismes (organes, cellules) ;
- de prendre en compte dans les études les caractéristiques biologiques des différentes espèces et des différentes voies d'exposition (eau, sols, sédiment, nourriture) dans l'évaluation des risques écologiques liés aux nanoparticules d'argent ;
- d'étudier leur transformation dans les organismes (ex : influence des sucs digestifs) ;
- d'identifier les mécanismes responsables de leur toxicité. Utilisation de biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique (sub-organismal, organisme, population) ;
- de renforcer les études portant sur le transfert des nanoparticules d'argent dans les réseaux trophiques ;

Activité antibactérienne et résistance bactérienne

Considérant :

- le nombre élevé de publications scientifiques et le rapport du Scenihp de décembre 2013 sur les nanoparticules d'argent ;
- l'hétérogénéité des résultats des travaux publiés, sont souvent contradictoires ;
- la dépendance de la réactivité des nanoparticules d'argent vis-à-vis de leur environnement (cellule, polymère, dispersants, ions, etc.) et la présence d'impuretés déposées lors de leurs procédés de fabrication ;
- les progrès sur la compréhension des modes d'action respectifs des nanoparticules d'argent et de l'ion argent sur l'activité antibactérienne en laboratoire ;
- la capacité d'adaptation des bactéries à l'ion argent monovalent et les résistances croisées à certains antibiotiques au niveau du laboratoire ;
- les difficultés à déterminer les mécanismes d'action de résistance de l'argent sous sa forme nanoparticulaire ;

Le groupe de travail recommande :

- de renseigner systématiquement et le plus précisément possible les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'argent associées à l'état brut (impuretés de synthèse incluses) ou après leurs dispersions (présence de co-formulants ou de tensio-actifs). Ces informations essentielles permettent l'interprétation et la comparaison des résultats d'études sur l'activité antimicrobienne en différenciant l'effet des nanoparticules d'argent de ceux de l'ion argent ;
- de développer des outils et des protocoles standardisés pour évaluer des niveaux de résistance et garantir l'interprétation des résultats, ainsi de faciliter les comparaisons entre études ;
- de développer des études sur la résistance bactérienne en milieu naturel tout comme des études épidémiologiques pour étudier la prévalence de gènes de résistance sur le terrain ;
- de développer des stratégies de recherche permettant d'évaluer le transfert de gène de résistance et leur propagation ;
- d'étudier la stabilité des paramètres physicochimiques (en particulier dissolution et spéciation) en fonction du milieu (ions, protéines, dispersants, etc.) et de leurs évolutions dans le temps et des étapes du cycle de vie de ces nanoparticules d'argent.

➤ **Agir dans un contexte d'incertitude scientifique concernant les risques potentiels associés aux nanoparticules d'argent**

Considérant :

- l'inexistence, aujourd'hui, d'un inventaire permettant d'assurer la traçabilité des nanoparticules d'argent tout au long de leur cycle de vie ;
- l'insuffisance et le caractère lacunaire des données d'exposition disponibles sur les nanoparticules d'argent et sur les produits en contenant ;
- l'hétérogénéité des définitions adoptées pour la prise en compte de la spécificité des nanomatériaux dans les réglementations existantes ;
- l'entrée en vigueur, depuis le 1er janvier 2013, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-8 du Code de l'environnement, de la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire fabriquées, importées ou distribuées sur le territoire français ;
- le caractère insuffisant, voire inexistant, des informations destinées aux consommateurs et à la population générale (étiquetage et/ou informations issues de la déclaration obligatoire) en application des réglementations existantes ;
- la difficulté persistante pour différencier les effets qui sont dus à l'ion argent de ceux que l'on peut directement imputer aux nanoparticules d'argent (voire leurs effets combinés quand ils sont tous les deux présents) ;

le groupe de travail recommande :

en matière d'encadrement réglementaire

- de faire évoluer l'obligation de déclaration sur plusieurs points :
 - o en l'étendant aux distributeurs de produits grand public (et pas uniquement les distributeurs de produits destinés à des utilisateurs professionnels) ;
 - o en limitant les possibilités de demander la confidentialité de certaines informations ;
- de préciser les informations demandées dans le cadre de l'obligation de déclaration : en demandant aux déclarants de produire dès à présent une fiche descriptive des données de sécurité concernant les nanoparticules d'argent 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, par des fiches de données de sécurité adaptées et correctement renseignées. Les informations déclarées pourront être recensées dans une base de données, gérée dans un cadre transparent ;
- d'engager des recherches visant à évaluer la portée concrète de la mise en place d'obligations d'étiquetage dans des réglementations sectorielles (ex : cosmétiques) afin de mesurer la pertinence d'une extension de telles obligations dans le cadre de réglementations plus larges et la cohérence entre cet éventuel étiquetage et les données issues de la déclaration obligatoire des substances à l'état nanoparticulaire ;

en matière de recherche

- de développer des recherches visant la compréhension des mécanismes d'action (éco)toxiques, antibactériens et les possibles phénomènes de bactériorésistance associés en cherchant notamment à distinguer les effets dus à l'ion argent des effets dus à la nanoparticule de la même substance ;
- d'étudier (programmes de recherche) la possibilité de mettre en place, faute d'informations suffisantes sur les risques sanitaires et environnementaux potentiellement attachés aux nanoparticules d'argent, une procédure d'autorisation de mise sur le marché des produits en contenant, qui permettrait de limiter l'exposition des consommateurs, des travailleurs et

de l'environnement aux nanoparticules d'argent, dans le cadre d'une approche graduelle pour limiter aux usages essentiels le recours aux nanoparticules d'argent, pour lesquelles des alertes de danger ont été identifiées en :

- o favorisant les produits sûrs et équivalents en termes de fonction, d'efficacité dépourvus de nanoparticules d'argent ;
- o restreignant le recours aux produits susceptibles de libérer des nanoparticules d'argent ou des espèces chimiques pouvant présenter un risque pour l'homme ou pour l'environnement au cours de leur utilisation, sous contraintes 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 ;
- o restreignant le recours aux produits dont l'utilité démontrée serait faible pour les consommateurs, sur la base d'une analyse socio-économique de type bénéfices/risques.

Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail : 1^{er} avril 2014.

9 Bibliographie

Ahmadi F (2012) Impact of Different Levels of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) on Performance, Oxidative Enzymes and Blood Parameters in Broiler Chicks. *Pakistan veterinary journal* **32**(3), 325-328.

Ahmadi F, Rahimi F (2011) The effect of different levels of Nano silver on performance and retention of silver in edible tissues of broilers. *World applied science journal* **12**(1), 1-4.

Allen HJ, Impellitteri CA, Macke DA, Heckman JL, Poynton HC, Lazorchak JM, Govindaswamy S, Roose DL, Nadagouda MN (2010) Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**(12), 2742-2750.

Ansari MA (2011) Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections. *Biology and Medicine* **3**(2), 141-146.

Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM (2008) Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters* **179**(2), 93-100.

Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM (2009) Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **236**(3), 310-318.

Asare N, Instanes C, Sandberg WJ, Refsnes M, Schwarze P, Kruszewski M, Brunborg G (2012) Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* **291**(1-3), 65-72.

AshaRani PV, Hande MP, Valiyaveetil S (2009) Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology* **10**.

Asharani PV, Lian Wu Y, Gong Z, Valiyaveetil S (2008) Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* **19**(25), 255102. [In eng]

Asharani PV, Lianwu Y, Gong Z, Valiyaveetil S (2011) Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology* **5**(1), 43-54. [In eng]

AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S (2009) Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **3**(2), 279-290.

Auffan M, Bottero J-Y, Chaneac C, Rose J (2010) Inorganic manufactured nanoparticles: how their physicochemical properties influence their biological effects in aqueous environments. *Nanomedicine (London, England)* **5**(6), 999-1007. [In eng]

Auffan M, Matson CW, *et al.* (2013) Salinity-dependent silver nanoparticle uptake and transformation by Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos. *Nanotoxicology*, 1-10.

Austin CA, Umbreit TH, *et al.* (2012) Distribution of silver nanoparticles in pregnant mice and developing embryos. *Nanotoxicology* **6**(8), 912-922.

Ayala-Núñez NV, Villegas HHL, Turrent LdCI, Padilla CR (2009) Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale Does Matter. *NanoBiotechnology* **5**(1-4), 2-9. [In eng]

Bae E, Park H-J, Lee J, Kim Y, Yoon J, Park K, Choi K, Yi J (2010) Bacterial cytotoxicity of the silver nanoparticle related to physicochemical metrics and agglomeration properties. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**(10), 2154-2160.

Bandyopadhyay D, Baruah H, Gupta B, Sharma S (2012) Silver nano particles prevent platelet adhesion on immobilized fibrinogen. *Indian journal of clinical biochemistry* **27**(2), 164-170. [In eng]

Bartłomiejczyk T, Lankoff A, Kruszewski M, Szumiel I (2013) Silver nanoparticles -- allies or adversaries? *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM* **20**(1), 48-54. [In eng]

Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS, Autrup H (2012) Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters* **208**(3), 286-292.

Bidgoli SA, Mahdavi M, Rezayat SM, Korani M, Amani A, Ziarati P (2013) Toxicity Assessment of Nanosilver Wound Dressing in Wistar Rat. *Acta Medica Iranica* **51**(4), 203-208. [In eng]

Bilberg K, Hovgaard MB, Besenbacher F, Baatrup E (2011) In Vivo Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology* **2012**. [In eng]

Bilberg K, Malte H, Wang T, Baatrup E (2010) Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology* **96**(2), 159-165.

Böhmert L, Niemann B, Thünemann AF, Lampen A (2012) Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. *Archives of Toxicology* **86**(7), 1107-1115.

Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A (2013) Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of Toxicology* **87**(7), 1181-1200.

Bouwmeester H, Poortman J, *et al.* (2011) Characterization of translocation of silver nanoparticles and effects on whole-genome gene expression using an in vitro intestinal epithelium coculture model. *ACS nano* **5**(5), 4091-4103. [In eng]

Bradford A, Handy RD, Readman JW, Atfield A, Mühling M (2009) Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. *Environmental Science & Technology* **43**(12), 4530-4536. [In eng]

- Buffet P-E, Pan J-F, *et al.* (2013) Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **89**, 117-124.
- Burchardt AD, Carvalho RN, *et al.* (2012) Effects of Silver Nanoparticles in Diatom *Thalassiosira pseudonana* and Cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Environmental Science & Technology* **46**(20), 11336-11344.
- Canesi L, Ciacci C, Fabbri R, Marcomini A, Pojana G, Gallo G (2012) Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research* **76**, 16-21.
- Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry, Part B* **112**(43), 13608-13619. [In eng]
- Chae YJ, Pham CH, Lee J, Bae E, Yi J, Gu MB (2009) Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* **94**(4), 320-327.
- Chauke N, Siebrits FK (2012) Evaluation of silver nanoparticles as a possible coccidiostat in broiler production. *South African Journal of Animal Science* **42**(5), 493-497.
- Chen X, Schluesener HJ (2008) Nanosilver: A nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters* **176**(1), 1-12.
- Cho H, Sung J, Song K, Kim J, Ji J, Lee J, Ryu H, Ahn K, Yu I (2013) Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Lung Cells of Sprague Dawley Rats after 12 Weeks of Inhalation Exposure. *Toxics* **1**(1), 36-45. [In en]
- Choi O, Clevenger TE, Deng B, Surampalli RY, Ross Jr L, Hu Z (2009) Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Research* **43**(7), 1879-1886.
- Choi O, Deng KK, Kim N-J, Ross Jr L, Surampalli RY, Hu Z (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* **42**(12), 3066-3074.
- Chrastina A, Schnitzer JE (2010) Iodine-125 radiolabeling of silver nanoparticles for in vivo SPECT imaging. *International Journal of Nanomedicine* **5**, 653-659. [In eng]
- Colman BP, Arnaout CL, *et al.* (2013) Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario. *PLoS ONE* **8**(2), e57189. [In eng]
- Cong Y, Banta GT, Selck H, Berhanu D, Valsami-Jones E, Forbes VE (2011) Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete, *Nereis diversicolor*. *Aquatic Toxicology* **105**(3-4), 403-411.

Cronholm P, Karlsson HL, Hedberg J, Lowe TA, Winnberg L, Elihn K, Wallinder IO, Möller L (2013) Intracellular Uptake and Toxicity of Ag and CuO Nanoparticles: A Comparison Between Nanoparticles and their Corresponding Metal Ions. *Small* **9**(7), 970-982. [In en]

Croteau M-NI, Misra SK, Luoma SN, Valsami-Jones E (2011) Silver Bioaccumulation Dynamics in a Freshwater Invertebrate after Aqueous and Dietary Exposures to Nanosized and Ionic Ag. *Environmental Science & Technology* **45**(15), 6600-6607.

Cushen M, Kerry J, Morris M, Cruz-Romero M, Cummins E (2013) Migration and exposure assessment of silver from a PVC nanocomposite. *Food Chemistry* **139**(1-4), 389-397.

Das P, Xenopoulos MA, Williams CJ, Hoque ME, Metcalfe CD (2012) Effects of silver nanoparticles on bacterial activity in natural waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**(1), 122-130.

Dasari TP, Hwang H-M (2010) The effect of humic acids on the cytotoxicity of silver nanoparticles to a natural aquatic bacterial assemblage. *Science of The Total Environment* **408**(23), 5817-5823.

De Jong WH, Van Der Ven LTM, Sleijffers A, Park MVDZ, Jansen EHJM, Van Loveren H, Vandebriel RJ (2013) Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials* **34**(33), 8333-8343.

Demir E, Vales G, Kaya B, Creus A, Marcos R (2011) Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. *Nanotoxicology* **5**(3), 417-424.

Dong MS, Choi J-Y, *et al.* (2013) Gene expression profiling of kidneys from Sprague-Dawley rats following 12-week inhalation exposure to silver nanoparticles. *Toxicology Mechanisms and Methods* **23**(6), 437-448.

Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, *et al.* (2012) Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats: Biodistribution of nanosilver in rats. *Journal of Applied Toxicology* **32**(11), 920-928.

Ebabe Elle R, Gaillet S, Vidé J, Romain C, Lauret C, Rugani N, Cristol JP, Rouanet JM (2013) Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats: Effects on oxidative stress and inflammation. *Food and Chemical Toxicology* **60**, 297-301.

El Badawy AM, Silva RG, Morris B, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM (2011) Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **45**(1), 283-287.

Eom H-J, Choi J (2010) p38 MAPK Activation, DNA Damage, Cell Cycle Arrest and Apoptosis As Mechanisms of Toxicity of Silver Nanoparticles in Jurkat T Cells. *Environmental Science & Technology* **44**(21), 8337-8342.

Ernest V, George Priya Doss C, Muthiah A, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2013) Genotoxicity assessment of low concentration AgNPs to human peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **5**(2), 377-381. [In English]

Fabrega J, Fawcett SR, Renshaw JC, Lead JR (2009) Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter. *Environmental Science & Technology* **43**(19), 7285-7290. [In eng]

Fabrega J, Luoma SN, Tyler CR, Galloway TS, Lead JR (2011a) Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International* **37**(2), 517-31. [In eng]

Fabrega J, Luoma SN, Tyler CR, Galloway TS, Lead JR (2011b) Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International* **37**(2), 517-531.

Fabrega J, Renshaw JC, Lead JR (2009) Interactions of Silver Nanoparticles with *Pseudomonas putida* Biofilms. *Environmental Science & Technology* **43**(23), 9004-9009.

Farkas J, Christian P, Gallego-Urrea JA, Roos N, Hassellöv M, Tollefsen KE, Thomas KV (2011) Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquatic Toxicology* **101**(1), 117-125.

Farkas J, Christian P, Urrea JA, Roos N, Hasselov M, Tollefsen KE, Thomas KV (2010) Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol* **96**(1), 44-52. [In eng]

Farkas J, Peter H, *et al.* (2011) Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environment International* **37**(6), 1057-1062.

Farmen E, Mikkelsen HN, Evensen ø, Einset J, Heier LS, Rosseland BO, Salbu B, Tollefsen KE, Oughton DH (2012) Acute and sub-lethal effects in juvenile Atlantic salmon exposed to low µg/L concentrations of Ag nanoparticles. *Aquatic Toxicology* **108**, 78-84.

Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R (2010) Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **6**(1), 103-109.

Flower NAL, Brabu B, Revathy M, Gopalakrishnan C, Raja SVK, Murugan SS, Kumaravel TS (2012) Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. *Mutation Research* **742**(1-2), 61-65.

Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H (2011) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology* **85**(7), 743-750.

Foldbjerg R, Irving ES, Hayashi Y, Sutherland DS, Thorsen K, Autrup H, Beer C (2012) Global gene expression profiling of human lung epithelial cells after exposure to nanosilver. *Toxicological Sciences* **130**(1), 145-157. [In eng]

Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H (2009) PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters* **190**(2), 156-162.

Fowler P, Smith R, Smith K, Young J, Jeffrey L, Kirkland D, Pfuhler S, Carmichael P (2012) Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. II. Importance of accurate toxicity measurement. *Mutation Research* **747**(1), 104-117. [In eng]

Gagné F, André C, Skirrow R, Gélinas M, Auclair J, van Aggelen G, Turcotte P, Gagnon C (2012) Toxicity of silver nanoparticles to rainbow trout: A toxicogenomic approach. *Chemosphere* **89**(5), 615-622.

Gaiser BK, Fernandes TF, Jepson M, Lead JR, Tyler CR, Stone V (2009) Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments. *Environmental Health* **8**(Suppl 1).

Gaiser BK, Fernandes TF, *et al.* (2012) Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**(1), 144-154.

Gaiser BK, Hirn S, *et al.* (2013) Effects of Silver Nanoparticles on the Liver and Hepatocytes In Vitro. *Toxicological Sciences* **131**(2), 537-547. [In en]

Gao J, Youn S, Hovsepian A, Llana VL, Wang Y, Bitton G, Bonzongo J-CJ (2009) Dispersion and toxicity of selected manufactured nanomaterials in natural river water samples: effects of water chemical composition. *Environmental Science & Technology* **43**(9), 3322-3328. [In eng]

García-Alonso J, Khan FR, Misra SK, Turmaine M, Smith BD, Rainbow PS, Luoma SN, Valsami-Jones E (2011) Cellular Internalization of Silver Nanoparticles in Gut Epithelia of the Estuarine Polychaete *Nereis diversicolor*. *Environmental Science & Technology* **45**(10), 4630-4636.

García A, Delgado L, Torà JA, Casals E, González E, Puentes V, Font X, Carrera J, Sánchez A (2012) Effect of cerium dioxide, titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles on the activity of microbial communities intended in wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials* **199-200**, 64-72.

Garza-Ocañas L, Ferrer DA, Burt J, Diaz-Torres LA, Cabrera MR, Rodríguez VT, Rangel RL, Romanovicz D, Jose-Yacamán M (2010) Biodistribution and long-term fate of silver nanoparticles functionalized with bovine serum albumin in rats. *Metallomics* **2**(3), 204-210. [In en]

Genter MB, Newman NC, Shertzer HG, Ali SF, Bolon B (2012) Distribution and systemic effects of intranasally administered 25 nm silver nanoparticles in adult mice. *Toxicologic pathology* **40**(7), 1004-1013. [In eng]

George R, Merten S, Wang TT, Kennedy P, Maitz P (2013) In vivo analysis of dermal and systemic absorption of silver nanoparticles through healthy human skin. *Australasian Journal of Dermatology*, n/a-n/a. [In en]

Ghorbanzadeh V, Moshtaghian SJ, Habibian S, Ebadi AG, VandeChali OB (2012) 613 - EJEB-2012-2-4-1367-1369.pdf. *European Journal of Experimental Biology* **2**(4), 1367-1369.

- Ghosh M, J M, Sinha S, Chakraborty A, Mallick SK, Bandyopadhyay M, Mukherjee A (2012) In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research* **749**(1–2), 60-69.
- Gomes T, Araújo O, Pereira R, Almeida AC, Cravo A, Bebianno MJ (2013) Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* **84**, 51-59.
- Gomes T, Pereira CG, Cardoso C, Bebianno MJ (2013) Differential protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nano and ionic Ag. *Aquatic Toxicology* **136-137**, 79-90. [In eng]
- Gorth D, Rand D, Webster TJ (2011) Silver nanoparticle toxicity in *Drosophila*: size does matter. *International Journal of Nanomedicine*.
- Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW, Nowack B (2009) Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environmental Science & Technology* **43**(24), 9216-9222.
- Greulich C, Kittler S, Eppler M, Muhr G, Köller M (2009) Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie* **394**(3), 495-502.
- Griffitt RJ, Hyndman K, Denslow ND, Barber DS (2009) Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. *Toxicological Sciences* **107**(2), 404-415. [In en]
- Griffitt RJ, Luo J, Gao J, Bonzongo J-C, Barber DS (2008) EFFECTS OF PARTICLE COMPOSITION AND SPECIES ON TOXICITY OF METALLIC NANOMATERIALS IN AQUATIC ORGANISMS. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(9).
- Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, *et al.* (2012) Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters* **214**(3), 251-258. [In eng]
- Gurunathan S, Lee K-J, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH (2009) Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials* **30**(31), 6341-6350. [In eng]
- Guzman M, Dille J, Godet S (2012) Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **8**(1), 37-45.
- Haase A, Rott S, *et al.* (2012) Effects of Silver Nanoparticles on Primary Mixed Neural Cell Cultures: Uptake, Oxidative Stress and Acute Calcium Responses. *Toxicological Sciences* **126**(2), 457-468.
- Haberl N, Hirn S, Wenk A, Diendorf J, Eppler M, Johnston BD, Krombach F, Kreyling WG, Schleh C (2013) Cytotoxic and proinflammatory effects of PVP-coated silver nanoparticles after intratracheal instillation in rats. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **4**, 933-940.

Hackenberg S, Scherzed A, *et al.* (2011) Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters* **201**(1), 27-33.

Hadrup N, Lam HR, Loeschner K, Mortensen A, Larsen EH, Frandsen H (2012) Nanoparticulate silver increases uric acid and allantoin excretion in rats, as identified by metabolomics. *Journal of Applied Toxicology* **32**(11), 929-933. [In eng]

Hall Sedlak R, Hnilova M, Grosh C, Fong H, Baneyx F, Schwartz D, Sarikaya M, Tamerler C, Traxler B (2012) Engineered Escherichia coli Silver-Binding Periplasmic Protein That Promotes Silver Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(7), 2289-2296.

Han D-W, Woo YI, Lee MH, Lee JH, Lee J, Park J-C (2012) In-Vivo and In-Vitro Biocompatibility Evaluations of Silver Nanoparticles with Antimicrobial Activity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **12**(7), 5205-5209.

Hartmann A, Plappert U, Poetter F, Suter W (2003) Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research* **536**(1-2), 27-38. [In eng]

Hendren CO, Mesnard X, Dröge J, Wiesner MR (2011) Estimating Production Data for Five Engineered Nanomaterials As a Basis for Exposure Assessment. *Environmental Science & Technology* **45**(7), 2562-2569.

Heydarnejad MS, Yarmohammadi-Samani P, Dehkordi MM, Shadkhast M, Rahnema S (2014) Histopathological effects of nanosilver (Ag-NPs) in liver after dermal exposure during wound healing. *Nanomedicine Journal* **1**(3), 191-197.

Holder AL, Marr LC (2013) Toxicity of Silver Nanoparticles at the Air-Liquid Interface. *BioMed Research International* **2013**.

Hong J-S, Kim S, *et al.* (2014) Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. *Nanotoxicology* **8**(4), 349-362. [In eng]

Honma M, Hayashi M (2011) Comparison of in vitro micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **52**(5), 373-384. [In eng]

Hosseini F, Mirzaii M, Salehi M (2011) The Study of Cross-Resistance Between Silver and Antibiotics in Isolated Bacterial Strains From A Burns Unit. *Advances in Environmental Biology* **5**(10), 3164-3172.

Hritcu L, Stefan M, Ursu L, Neagu A, Mihasan M, Tartau L, Melnig V (2011) Exposure to silver nanoparticles induces oxidative stress and memory deficits in laboratory rats. *Central European Journal of Biology* **6**(4), 497-509. [In en]

Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ (2005) In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro* **19**(7), 975-983.

Jeong GN, Jo UB, Ryu HY, Kim YS, Song KS, Yu IJ (2010) Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Archives of toxicology* **84**(1), 63-69. [In eng]

Ji JH, Jung JH, *et al.* (2007) Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology* **19**(10), 857-871. [In eng]

Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V (2010) A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **40**(4), 328-346.

Jun E-A, Lim K-M, Kim K, Bae O-N, Noh J-Y, Chung K-H, Chung J-H (2011) Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity. *Nanotoxicology* **5**(2), 157-167. [In eng]

Kaegi R, Voegelin A, Sinnet B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Burkhardt M, Siegrist H (2011) Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol* **45**(9), 3902-8. [In eng]

Kalishwaralal K, Banumathi E, Pandian SRK, Deepak V, Muniyandi J, Eom SH, Gurunathan S (2009) Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **73**(1), 51-57.

Kawata K, Osawa M, Okabe S (2009) In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science & Technology* **43**(15), 6046-6051. [In eng]

Kennedy AJ, Hull MS, Bednar AJ, Goss JD, Gunter JC, Bouldin JL, Vikesland PJ, Steevens JA (2010) Fractionating Nanosilver: Importance for Determining Toxicity to Aquatic Test Organisms. *Environmental Science & Technology* **44**(24), 9571-9577.

Kenyon MO, Cheung JR, Dobo KL, Ku WW (2007) An evaluation of the sensitivity of the Ames assay to discern low-level mutagenic impurities. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* **48**(1), 75-86. [In eng]

Kermanizadeh A, Chauché C, Balharry D, Brown DM, Kanase N, Boczkowski J, Lanone S, Stone V (2013) The role of Kupffer cells in the hepatic response to silver nanoparticles. *Nanotoxicology*. [In Eng]

Kermanizadeh A, Gaiser BK, Hutchison GR, Stone V (2012) An in vitro liver model - assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology* **9**(1). [In en]

Kermanizadeh A, Pojana G, *et al.* (2013) In vitro assessment of engineered nanomaterials using a hepatocyte cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory cytokines and functional markers. *Nanotoxicology* **7**(3), 301-13. [In eng]



Kermanizadeh A, Vranic S, Boland S, Moreau K, Baeza-Squiban A, Gaiser BK, Andrzejczuk LA, Stone V (2013) An in vitro assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. *BMC Nephrology* **14**(1). [In en]

Khan S, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2011) Silver nanoparticles tolerant bacteria from sewage environment. *Journal of Environmental Sciences (China)* **23**(2), 346-352. [In eng]

Kim HR, Kim MJ, Lee SY, Oh SM, Chung KH (2011) Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutation Research* **726**(2), 129-135.

Kim HR, Park YJ, Shin DY, Oh SM, Chung KH (2013) Appropriate in vitro methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. *Environmental Health and Toxicology* **28**. [In eng]

Kim JS, Kuk E, *et al.* (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* **3**(1), 95-101.

Kim JS, Song KS, Sung JH, Ryu HR, Choi BG, Cho HS, Lee JK, Yu IJ (2013) Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation evaluation of silver nanoparticles. *Nanotoxicology* **7**(5), 953-960.

Kim JS, Sung JH, Ji JH, Song KS, Lee JH, Kang CS, Yu IJ (2011) In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure. *Safety and Health at Work* **2**(1), 34-8. [In eng]

Kim S, Choi JE, Choi J, Chung K-H, Park K, Yi J, Ryu D-Y (2009) Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro* **23**(6), 1076-1084.

Kim SW, Nam S-H, An Y-J (2012) Interaction of silver nanoparticles with biological surfaces of *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and environmental safety* **77**, 64-70. [In eng]

Kim T-H, Kim M, Park H-S, Shin US, Gong M-S, Kim H-W (2012) Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **100A**(4), 1033-1043.

Kim YS, Kim JS, *et al.* (2008) Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology* **20**(6), 575-83. [In eng]

Kim YS, Song MY, *et al.* (2010) Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology* **7**(1).

Korani M, Rezayat SM, Arbabi Bidgoli S (2013) Sub-chronic Dermal Toxicity of Silver Nanoparticles in Guinea Pig: Special Emphasis to Heart, Bone and Kidney Toxicities. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* **12**(3), 511-519.

Kremer AN, Hoffmann H (2012) Subtractive Hybridization Yields a Silver Resistance Determinant Unique to Nosocomial Pathogens in the *Enterobacter cloacae* Complex. *Journal of Clinical Microbiology* **50**(10), 3249-3257.

Kruszewski M, Grądzka I, *et al.* (2013) Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles. *Toxicology Letters* **219**(2), 151-159.

Kulthong K, Maniratanachote R, Kobayashi Y, Fukami T, Yokoi T (2012) Effects of silver nanoparticles on rat hepatic cytochrome P450 enzyme activity. *Xenobiotica* **42**(9), 854-862. [In eng]

Kwok KWH, Auffan M, Badireddy AR, Nelson CM, Wiesner MR, Chilkoti A, Liu J, Marinakos SM, Hinton DE (2012) Uptake of silver nanoparticles and toxicity to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*): effect of coating materials. *Aquatic Toxicology* **120-121**, 59-66. [In eng]

Kwon J-T, Minai-Tehrani A, *et al.* (2012) Acute pulmonary toxicity and body distribution of inhaled metallic silver nanoparticles. *Toxicological Research* **28**(1), 25-31. [In eng]

Laban G, Nies LF, Turco RF, Bickham JW, Sepúlveda MS (2009) The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology* **19**(1), 185-195.

Lafuente JV, Sharma A, Patnaik R, Muresanu DF, Sharma HS (2012) Diabetes exacerbates nanoparticles induced brain pathology. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* **11**(1), 26-39. [In eng]

Lankveld DPK, Oomen AG, Krystek P, Neigh A, Troost-de Jong A, Noorlander CW, Van Eijkeren JCH, Geertsma RE, De Jong WH (2010) The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* **31**(32), 8350-8361. [In eng]

Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G (2009) Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* **255**(1-2), 33-37.

Lavanya M, Veenavardhini SV, Gim GH (2013) Synthesis, Characterization and Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles using *Paederia foetida* L. leaf extract. *International Research Journal of Biological Sciences* **2**(3), 28-34.

Lee JH, Kim YS, *et al.* (2013) Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Particle and Fibre Toxicology* **10**.

Lee JH, Kwon M, Ji JH, Kang CS, Ahn KH, Han JH, Yu IJ (2011) Exposure assessment of workplaces manufacturing nanosized TiO₂ and silver. *Inhalation Toxicology* **23**(4), 226-236. [In eng]

Lee JH, Mun J, Park JD, Yu IJ (2012) A health surveillance case study on workers who manufacture silver nanomaterials. *Nanotoxicology* **6**(6), 667-669. [In eng]

Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, Osgood CJ, Xu X-HN (2007) In Vivo Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos. *ACS Nano* **1**(2), 133-143.

Lee T-Y, Liu M-S, Huang L-J, Lue S-I, Lin L-C, Kwan A-L, Yang R-C (2013) Bioenergetic failure correlates with autophagy and apoptosis in rat liver following silver nanoparticle intraperitoneal administration. *Particle and Fibre Toxicology* **10**(1). [In eng]

Lee W-M, Kwak JI, An Y-J (2012) Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* **86**(5), 491-499.

Lee Y-J, Kim J, Oh J, Bae S, Lee S, Hong IS, Kim S-H (2012a) Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**(1), 155-159.

Lee Y, Choi J, Kim P, Choi K, Kim S, Shon W, Park K (2012) A transfer of silver nanoparticles from pregnant rat to offspring. *Toxicological Research* **28**(3), 139-141. [In eng]

Lee Y, Kim P, Yoon J, Lee B, Choi K, Kil K-H, Park K (2012b) Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology*.

Levard C, Hotze EM, *et al.* (2013) Sulfidation of silver nanoparticles: natural antidote to their toxicity. *Environmental Science & Technology* **47**(23), 13440-13448. [In eng]

Levard C, Hotze EM, Lowry GV, Brown GE (2012) Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environmental Science & Technology* **46**(13), 6900-6914.

Levard C, Michel FM, Wang Y, Choi Y, Eng P, Brown GE (2011) Probing Ag nanoparticle surface oxidation in contact with (in)organics: an X-ray scattering and fluorescence yield approach. *Journal of Synchrotron Radiation* **18**(6), 871-878.

Li P-W, Kuo T-H, Chang J-H, Yeh J-M, Chan W-H (2010) Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. *Toxicology Letters* **197**(2), 82-87.

Li Y, Chen DH, Yan J, Chen Y, Mittelstaedt RA, Zhang Y, Biris AS, Heflich RH, Chen T (2012) Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutation Research* **745**(1-2), 4-10.

Lim D, Roh J-y, Eom H-j, Choi J-Y, Hyun J, Choi J (2012) Oxidative stress-related PMK-1 P38 MAPK activation as a mechanism for toxicity of silver nanoparticles to reproduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**(3), 585-592.

Liu H, Yang D, *et al.* (2013) Comparative study of respiratory tract immune toxicity induced by three sterilisation nanoparticles: silver, zinc oxide and titanium dioxide. *Journal of Hazardous Materials* **248-249**, 478-86. [In eng]

Liu J, Wang Z, Liu FD, Kane AB, Hurt RH (2012) Chemical Transformations of Nanosilver in Biological Environments. *ACS Nano* **6**(11), 9887-9899.

Liu P, Huang Z, Gu N (2013) Exposure to silver nanoparticles does not affect cognitive outcome or hippocampal neurogenesis in adult mice. *Ecotoxicol Environ Saf* **87**, 124-30. [In eng]

Liu W, Wu Y, *et al.* (2010) Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology* **4**(3), 319-330.

Liu Y, Guan W, Ren G, Yang Z (2012) The possible mechanism of silver nanoparticle impact on hippocampal synaptic plasticity and spatial cognition in rats. *Toxicology Letters* **209**(3), 227-231.

Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, Larsen A, Gao X, Vogel U, Mortensen A, Lam HR, Larsen EH (2011) Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Particle and Fibre Toxicology* **8**.

Loghman A, Iraj SH, Naghi DA, Pejman M (2014) Histopathologic and apoptotic effect of nanosilver in liver of broiler chickens. *African Journal of Biotechnology* **11**(22), 6207-6211. [In en]

Loh JV, Percival SL, Woods EJ, Williams NJ, Cochrane CA (2009) Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. *Int Wound J* **6**(1), 32-8. [In eng]

Lorenz C, Windler L, von Goetz N, Lehmann RP, Schuppler M, Hungerbühler K, Heuberger M, Nowack B (2012) Characterization of silver release from commercially available functional (nano)textiles. *Chemosphere* **89**(7), 817-824. [In eng]

Lowry GV, Espinasse BP, *et al.* (2012) Long-Term Transformation and Fate of Manufactured Ag Nanoparticles in a Simulated Large Scale Freshwater Emergent Wetland. *Environmental Science & Technology* **46**(13), 7027-7036.

Luther EM, Schmidt MM, Diendorf J, Eppe M, Dringen R (2012) Upregulation of metallothioneins after exposure of cultured primary astrocytes to silver nanoparticles. *Neurochemical Research* **37**(8), 1639-1648.

Ma R, Levard C, Judy JD, Unrine JM, Durenkamp M, Martin B, Jefferson B, Lowry GV (2014) Fate of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant and in Processed Biosolids. *Environmental Science & Technology* **48**(1), 104-112.

Ma R, Levard C, Marinakos SM, Cheng Y, Liu J, Michel FM, Brown GE, Lowry GV (2012) Size-Controlled Dissolution of Organic-Coated Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **46**(2), 752-759.

Maneewattanapinyo P, Banlunara W, Thammacharoen C, Ekgasit S, Kaewamatawong T (2011) An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles. *Journal of Veterinary Medical Science* **73**(11), 1417-1423. [In eng]



Martínez-Gutierrez F, Thi EP, *et al.* (2011) Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **8**(3), 328-336.

Mathias FT, Romano RM, Kizys MML, Kasamatsu T, Giannocco G, Chiamolera MI, Dias-da-Silva MR, Romano MA (2014) Daily exposure to silver nanoparticles during prepubertal development decreases adult sperm and reproductive parameters. *Nanotoxicology*, 1-7. [In en]

McLaughlin J, Bonzongo J-CJ (2012) Effects of natural water chemistry on nanosilver behavior and toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**(1), 168-175.

Mei N, Zhang Y, *et al.* (2012) Silver nanoparticle-induced mutations and oxidative stress in mouse lymphoma cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **53**(6), 409-419.

Melnik EA, Buzulukov YP, Demin VF, Demin VA, Gmoshinski IV, Tyshko NV, Tutelyan VA (2013) Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats. *Acta Naturae* **5**(3), 107-15. [In eng]

Meng J, Ji Y, Liu J, Cheng X, Guo H, Zhang W, Wu X, Xu H (2014) Using gold nanorods core/silver shell nanostructures as model material to probe biodistribution and toxic effects of silver nanoparticles in mice. *Nanotoxicology* **8**(6), 686-696.

Menon PK, Muresanu DF, Sharma A, Mössler H, Sharma HS (2012) Cerebrolysin, a mixture of neurotrophic factors induces marked neuroprotection in spinal cord injury following intoxication of engineered nanoparticles from metals. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* **11**(1), 40-49. [In eng]

Meyer JN, Lord CA, Yang XY, Turner EA, Badireddy AR, Marinakos SM, Chilkoti A, Wiesner MR, Auffan M (2010) Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquatic Toxicology* **100**(2), 140-150.

Miao A-J, Luo Z, Chen C-S, Chin W-C, Santschi PH, Quigg A (2010) Intracellular Uptake: A Possible Mechanism for Silver Engineered Nanoparticle Toxicity to a Freshwater Alga *Ochromonas danica*. *PLoS ONE* **5**(12).

Miao A-J, Schwehr KA, Xu C, Zhang S-J, Luo Z, Quigg A, Santschi PH (2009) The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution* **157**(11), 3034-3041.

Mirshokraei P, Hassanpour H, Akhavan Taheri M, Riyahi M, Shams-Esfandabadi N (2011) The in vitro effects of nanosilver colloid on kinematic parameters of ram spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research* **12**(4), 317-323.

Mitzel MR, Tufenkji N (2014) Transport of industrial PVP-stabilized silver nanoparticles in saturated quartz sand coated with *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm of variable age. *Environmental Science & Technology* **48**(5), 2715-2723. [In eng]

Moore MN (2006) Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* **32**(8), 967-976.

Mühling M, Bradford A, Readman JW, Somerfield PJ, Handy RD (2009) An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. *Marine Environmental Research* **68**(5), 278-283.

Mukherjee SG, O'Claonadh N, Casey A, Chambers G (2012) Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicology in Vitro* **26**(2), 238-251.

Müller L, Mauthe RJ, *et al.* (2006) A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* **44**(3), 198-211. [In eng]

Munger MA, Radwanski P, Hadlock GC, Stoddard G, Shaaban A, Falconer J, Grainger DW, Deering-Rice CE (2014) In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **10**(1), 1-9.

Nallathamby PD, Xu X-HN (2010) Study of cytotoxic and therapeutic effects of stable and purified silver nanoparticles on tumor cells. *Nanoscale* **2**(6).

Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R (2008) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* **42**(23), 8959-8964. [In eng]

Nguyen KC, Seligy VL, Massarsky A, Moon TW, Rippstein P, Tan J, Tayabali AF (2013) Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series* **429**(1). [In en]

Nymark P, Catalán J, *et al.* (2013) Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology* **313**(1), 38-48.

Orts-Gil G, Natte K, Österle W (2013) Multi-parametric reference nanomaterials for toxicology: state of the art, future challenges and potential candidates. *RSC Advances* **3**(40), 18202-18215. [In en]

Oukarroum A, Bras S, Perreault F, Popovic R (2012) Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **78**, 80-85.

Panáček A, Kolář M, Večeřová R, Pucek R, Soukupová J, Kryštof V, Hamal P, Zbořil R, Kvítek L (2009) Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* **30**(31), 6333-6340.

Panacek A, Pucek R, Safarova D, Dittrich M, Richtrova J, Benickova K, Zboril R, Kvítek L (2011) Acute and Chronic Toxicity Effects of Silver Nanoparticles (NPs) on *Drosophila melanogaster*. *Environmental Science & Technology* **45**(11), 4974-4979.

Park E-J, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, Yoon J, Lee BC, Park K (2010) Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **30**(2), 162-168.

Park K, Park E-J, Chun IK, Choi K, Lee SH, Yoon J, Lee BC (2011) Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Archives of Pharmacal Research* **34**(1), 153-158. [In eng]

Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJJ, Verharen HW, Briedé JJ, van Loveren H, de Jong WH (2011) The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* **32**(36), 9810-9817.

Philbrook NA, Winn LM, Afrooz ARMN, Saleh NB, Walker VK (2011) The effect of TiO₂ and Ag nanoparticles on reproduction and development of *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **257**(3), 429-436. [In eng]

Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, Choi J, Hyun JW (2011) Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters* **201**(1), 92-100.

Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B (2012) Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research* **14**(9), 1-11. [In en]

Prabhu S, Poulouse EK (2012) Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* **2**(1). [In en]

Prasad RY, McGee JK, Killius MG, Suarez DA, Blackman CF, DeMarini DM, Simmons SO (2013) Investigating oxidative stress and inflammatory responses elicited by silver nanoparticles using high-throughput reporter genes in HepG2 cells: effect of size, surface coating, and intracellular uptake. *Toxicology in Vitro* **27**(6), 2013-2021. [In eng]

Pratsinis A, Hervella P, Leroux J-C, Pratsinis SE, Sotiriou GA (2013) Toxicity of Silver Nanoparticles in Macrophages. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. [In Eng]

Proux O, Biquard X, *et al.* (2005) FAME: a new beamline for x-ray absorption investigations of very-diluted systems of environmental, material and biological interests. *Physica Scripta* **2005**(T115). [In en]

Proux O, Nassif V, Prat A, Ulrich O, Lahera E, Biquard X, Menthonnex JJ, Hazemann JL (2006) Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator: design and performances. *Journal of Synchrotron Radiation* **13**(Pt 1), 59-68. [In eng]

Quadros M, Pierson Iv R, Tulse N, Willis R, Rogers K, Thomas T, Marr LC (2013) Release of silver from nanotechnology-based consumer products for children. *Environmental Science & Technology*.

Quadros ME, Marr LC (2011) Silver nanoparticles and total aerosols emitted by nanotechnology-related consumer spray products. *Environmental Science & Technology* **45**(24), 10713-10719. [In eng]

Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK (2012) Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **112**(5), 841-852. [In eng]

Reidy B, Haase A, Luch A, Dawson K, Lynch I (2013) Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials* **6**(6), 2295-2350.

Reinsch BC, Levard C, Li Z, Ma R, Wise A, Gregory KB, Brown GE, Jr., Lowry GV (2012) Sulfidation of silver nanoparticles decreases *Escherichia coli* growth inhibition. *Environmental Science & Technology* **46**(13), 6992-7000. [In eng]

Rigo C, Ferroni L, *et al.* (2013) Active Silver Nanoparticles for Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences* **14**(3), 4817-4840. [In en]

Roberts JR, McKinney W, *et al.* (2013) Pulmonary and Cardiovascular Responses of Rats to Inhalation of Silver Nanoparticles. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **76**(11), 651-668.

Roh J-Y, Sim SJ, Yi J, Park K, Chung KH, Ryu D-Y, Choi J (2009) Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. *Environmental Science & Technology* **43**(10), 3933-3940. [In eng]

Samberg ME, Oldenburg SJ, Monteiro-Riviere NA (2010) Evaluation of Silver Nanoparticle Toxicity in Skin in Vivo and Keratinocytes in Vitro. *Environmental Health Perspectives* **118**(3), 407-413.

Sanpui P, Chattopadhyay A, Ghosh SS (2011) Induction of apoptosis in cancer cells at low silver nanoparticle concentrations using chitosan nanocarrier. *ACS applied materials & interfaces* **3**(2), 218-228. [In eng]

Sardari RRR, Zarchi SR, Talebi A, Sima N, Imani S, Khoradmehr A, Sheshde SAR (2012) Toxicological effects of silver nanoparticles in rats. *African Journal of Microbiology Research* **6**(27), 5587-5593.

Schinwald A, Chernova T, Donaldson K (2012) Use of silver nanowires to determine thresholds for fibre length-dependent pulmonary inflammation and inhibition of macrophage migration in vitro. *Particle and Fibre Toxicology* **9**. [In eng]

Scown TM, Santos EM, *et al.* (2010) Effects of Aqueous Exposure to Silver Nanoparticles of Different Sizes in Rainbow Trout. *Toxicological Sciences* **115**(2), 521-534.

Shahare B, Yashpal M (2013) Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicology Mechanisms and Methods* **23**(3), 161-167. [In eng]

Sharma HS, Sharma A (2012) Neurotoxicity of engineered nanoparticles from metals. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* **11**(1), 65-80.

Shoults-Wilson WA, Reinsch BC, Tsyusko OV, Bertsch PM, Lowry GV, Unrine JM (2011) Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*). *Nanotoxicology* **5**(3), 432-444.

Singh RP, Ramarao P (2012) Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicology Letters* **213**(2), 249-259.

Šinko G, Vinković Vrček I, Goessler W, Leitinger G, Dijanošić A, Miljanić S (2013) Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism of silver nanoparticle toxicity. *Environmental Science and Pollution Research* **21**(2), 1391-1400.

Söderstjerna E, Johansson F, Klefbohm B, Englund Johansson U (2013) Gold- and silver nanoparticles affect the growth characteristics of human embryonic neural precursor cells. *PLoS ONE* **8**(3). [In eng]

Song KS, Sung JH, *et al.* (2013) Recovery from silver-nanoparticle-exposure-induced lung inflammation and lung function changes in Sprague Dawley rats. *Nanotoxicology* **7**(2), 169-180. [In eng]

Song M-F, Li Y-S, Kasai H, Kawai K (2012) Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **50**(3), 211-216.

Speit G, Vasquez M, Hartmann A (2009) The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutation Research* **681**(1), 3-12. [In eng]

Sriram MI, Kanth SBM, Kalishwaralal K, Gurunathan S (2010) Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *International journal of Nanomedicine* **5**, 753-762. [In eng]

Stebounova LV, Adamcakova-Dodd A, Kim JS, Park H, O'Shaughnessy PT, Grassian VH, Thorne PS (2011) Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model. *Particle and Fibre Toxicology* **8**(1), 5. [In en]

Sung JH, Ji JH, *et al.* (2009) Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences* **108**(2), 452-461.

Sung JH, Ji JH, Song KS, Lee JH, Choi KH, Lee SH, Yu IJ (2011) Acute inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicology and Industrial Health* **27**(2), 149-154.

Sung JH, Ji JH, *et al.* (2008) Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhalation Toxicology* **20**(6), 567-74. [In eng]

Suresh AK, Pelletier DA, *et al.* (2010) Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. *Environ Sci Technol* **44**(13), 5210-5. [In eng]

Suresh AK, Pelletier DA, Wang W, Morrell-Falvey JL, Gu B, Doktycz MJ (2012) Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **28**(5), 2727-2735. [In eng]

Suriyakalaa U, Antony JJ, Suganya S, Siva D, Sukirtha R, Kamalakkannan S, Pichiah PBT, Achiraman S (2013) Hepatocurative activity of biosynthesized silver nanoparticles fabricated using *Andrographis paniculata*. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **102**, 189-194. [In eng]

Tang J, Xiong L, *et al.* (2010) Silver nanoparticles crossing through and distribution in the blood-brain barrier in vitro. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **10**(10), 6313-6317.

Teodoro JS, Simões AM, Duarte FV, Rolo AP, Murdoch RC, Hussain SM, Palmeira CM (2011) Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective. *Toxicology in Vitro* **25**(3), 664-670.

Tice RR, Agurell E, *et al.* (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **35**(3), 206-221. [In eng]

Tiedemann D, Taylor U, Rehbock C, Jakobi J, Klein S, Kues WA, Barcikowski S, Rath D (2014) Reprotoxicity of gold, silver, and gold-silver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *The Analyst* **139**(5).

Tiwari DK, Jin T, Behari J (2011) Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* **21**(1), 13-24.

Trickler WJ, Lantz SM, *et al.* (2010) Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells. *Toxicological Sciences* **118**(1), 160-170. [In eng]

Trop M, Novak M, Rodl S, Hellbom B, Kroell W, Goessler W (2006) Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *Journal of Trauma* **60**(3), 648-652. [In eng]

Turner A, Brice D, Brown MT (2012) Interactions of silver nanoparticles with the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology* **21**(1), 148-154.

van der Zande M, Vandebriel RJ, *et al.* (2012) Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS nano* **6**(8), 7427-7442.

Vlachou E, Chipp E, Shale E, Wilson YT, Papini R, Moiemmen NS (2007) The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: A study of systemic silver absorption. *Burns* **33**(8), 979-985.

Völker C, Oetken M, Oehlmann J (2013) The biological effects and possible modes of action of nanosilver. *Reviews of environmental contamination and toxicology* **223**, 81-106.

von Goetz N, Fabricius L, Glaus R, Weitbrecht V, Gunther D, Hungerbühler K (2013a) Migration of silver from commercial plastic food containers and implications for consumer exposure assessment. *Food Additives & Contaminants, Part A* **30**(3), 612-20. [In eng]

von Goetz N, Fabricius L, Glaus R, Weitbrecht V, Günther D, Hungerbühler K (2013b) Migration of silver from commercial plastic food containers and implications for consumer exposure assessment. *Food Additives & Contaminants, Part A* **30**(3), 612-620. [In eng]

Wang H, Wu L, Reinhard BM (2012) Scavenger receptor mediated endocytosis of silver nanoparticles into J774A.1 macrophages is heterogeneous. *ACS nano* **6**(8), 7122-7132. [In eng]

Wang X, Ji Z, *et al.* (2014a) Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **10**(2), 385-398. [In eng]

Wang X, Ji Z, *et al.* (2014b) Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. *Small* **10**(2), 385-98. [In eng]

Wang Z, Qu G, Su L, Wang L, Yang Z, Jiang J, Liu S, Jiang G (2013) Evaluation of the biological fate and the transport through biological barriers of nanosilver in mice. *Current pharmaceutical design* **19**(37), 6691-6697. [In eng]

Ward JE, Kach DJ (2009) Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research* **68**(3), 137-142.

Wąsowicz W, Cieślak M, Palus J, Stańczyk M, Dziubałtowska E, Stępnik M, Dückler M (2011) Evaluation of biological effects of nanomaterials. Part I. Cyto- and genotoxicity of nanosilver composites applied in textile technologies. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* **24**(4), 348-358.

Wei L, Tang J, Zhang Z, Chen Y, Zhou G, Xi T (2010) Investigation of the cytotoxicity mechanism of silver nanoparticles *in vitro*. *Biomedical Materials* **5**(4).

Whitley AR, Levard C, Oostveen E, Bertsch PM, Matocha CJ, von der Kammer F, Unrine JM (2013) Behavior of Ag nanoparticles in soil: effects of particle surface coating, aging and sewage sludge amendment. *Environmental Pollution* **182**, 141-149. [In eng]

Wong KKY, Cheung SOF, Huang L, Niu J, Tao C, Ho C-M, Che C-M, Tam PKH (2009) Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem* **4**(7), 1129-1135.

Xiao Y, Wiesner MR (2013) Transport and retention of selected engineered nanoparticles by porous media in the presence of a biofilm. *Environmental Science & Technology* **47**(5), 2246-2253. [In eng]

- Xiu Z-M, Ma J, Alvarez PJJ (2011) Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environmental Science & Technology* **45**(20), 9003-9008. [In eng]
- Xu F, Pielt C, Farkas S, Qazzaz M, Syed NI (2013) Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons. *Molecular Brain* **6**(1). [In Eng]
- Xu XH, Brownlow WJ, Kyriacou SV, Wan Q, Viola JJ (2004) Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry* **43**(32), 10400-13. [In eng]
- Xu Y, Tang H, Liu J-H, Wang H, Liu Y (2013) Evaluation of the adjuvant effect of silver nanoparticles both in vitro and in vivo. *Toxicology Letters* **219**(1), 42-48. [In eng]
- Xue Y, Zhang S, Huang Y, Zhang T, Liu X, Hu Y, Zhang Z, Tang M (2012) Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *Journal of Applied Toxicology* **32**(11), 890-899. [In en]
- Yang X, Gondikas AP, Marinakos SM, Auffan M, Liu J, Hsu-Kim H, Meyer JN (2012) Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science & Technology* **46**(2), 1119-1127.
- Yen H-J, Hsu S-h, Tsai C-L (2009) Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small* **5**(13), 1553-1561.
- Yeo MK, Kang M (2008) Effects of Nanometer Sized Silver Materials on Biological Toxicity During Zebrafish Embryogenesis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **29**(6), 1179-1184.
- Yeo MK, Pak S-W (2008) Exposing Zebrafish to Silver Nanoparticles during Caudal Fin Regeneration Disrupts Caudal Fin Growth and p53 Signaling. *Molecular and Cellular Toxicology* **4**(4), 311-317.
- Yeo MK, Yoon J-W (2009) Comparison of the Effects of Nano-silver Antibacterial Coatings and Silver Ions on Zebrafish Embryogenesis. *Molecular and Cellular Toxicology* **5**(1), 23-31.
- Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, Auffan M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES (2011) More than the Ions: The Effects of Silver Nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology* **45**(6), 2360-2367.
- Yu S-J, Chao J-B, Sun J, Yin Y-G, Liu J-F, Jiang G-B (2013) Quantification of the Uptake of Silver Nanoparticles and Ions to HepG2 Cells. *Environmental Science & Technology*.
- Yu W-J, Son J-M, et al. (2013) Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *Nanotoxicology*, 1-7.

Zhang H, Smith JA, Oyanedel-Craver V (2012) The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers. *Water Research* **46**(3), 691-699.

Zhao C-M, Wang W-X (2011) Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**(4), 885-892. [In eng]

Zhao C-M, Wang W-X (2012) Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* **6**(4), 361-370.

Afssa (2008) Les nanoparticules manufacturées dans l'eau. Afssa, Maisons-Alfort.

Afssa (2009) Nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale. Afssa, Maisons-Alfort.

Afsset (2010) Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement. Afsset, Maisons-Alfort.

Anses (2014) Évaluation des risques liés aux nanomatériaux : Enjeux et mise à jour des connaissances. Rapport d'expertise collective Auto-saisine n° 2012-SA-0273. Anses, Maisons-Alfort.

JRC (2011) NM-Series of Representative Manufactured Nanomaterials NM-300 Silver Characterisation, Stability, Homogeneity. JRC, No. EUR 24693 EN, Luxembourg.

Scenihr (2010) Scientific Basis for the Definition of the Term "nanomaterial". Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks Brussels, Belgium.

Scenihr (2013) Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks

Ministère du Développement d. Bilan de la première année de déclaration - Ministère du Développement durable. 2013/12/06/

2014/04/07/15:51:08. En ligne: <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Bilan-de-la-premiere-annee-de.htmlfiles/2819/Bilan-de-la-premiere-annee-de.html>

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine

→ AD
Classe 4
AM.



11-484 2011-SA-0224
COURRIER ARRIVE
17 AOUT 2011
DIRECTION GENERALE
→ CTS

MINISTÈRE DU TRAVAIL, DE L'EMPLOI
ET DE LA SANTÉ

Direction générale de la santé
Direction générale du travail

MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE, DES FINANCES
ET DE L'INDUSTRIE

Direction générale de la concurrence, de la
consommation et de la répression des fraudes

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE
L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE, DE LA
RURALITÉ ET DE L'AMÉNAGEMENT DU
TERRITOIRE

Direction générale de l'alimentation

MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE, DU
DEVELOPPEMENT DURABLE, DES TRANSPORTS
ET DU LOGEMENT

Direction générale de la prévention des risques

Paris, le 10 AOU 2011

Le Directeur général de la santé,

Le Directeur général du travail,

La Directrice générale de l'alimentation,

La Directrice générale de la concurrence, de la
consommation et de la répression des fraudes

Le Directeur général de la prévention des
risques,

à

Monsieur le Directeur général de l'Anses
27-31 avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort

Objet : Mise à jour de l'expertise relative à l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale, pour l'alimentation et pour l'environnement : cas particulier du nano-argent

L'institut fédéral d'évaluation des risques allemand (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR), a recommandé, dans son avis du 28 décembre 2009 sur la toxicité des nanoparticules d'argent, de supprimer toute utilisation de l'argent sous forme nanométrique dans les denrées alimentaires et les produits de consommation courante, dans l'attente de disposer de données suffisantes pour l'évaluation des risques liés à ces expositions. A la suite de cette recommandation, le BfR a constitué un groupe de travail réunissant les différentes parties prenantes (représentants d'industries, d'associations de consommateurs, de chercheurs et d'experts scientifiques). Ce groupe de travail avait pour objectif de :

- vérifier la faisabilité d'une évaluation des risques liés au nano-argent,
- identifier les options possibles pour assurer la protection des consommateurs en l'état actuel des connaissances.

Les résultats des travaux du groupe ayant confirmé les conclusions du BfR de 2009, l'institut a donc renouvelé, le 12 avril 2011, sa recommandation visant à suspendre l'utilisation de l'argent sous forme nanométrique dans les denrées alimentaires et les produits de consommation courante.

Concernant le risque lié à l'utilisation de nano-argent, votre agence a conclu, dans son avis de mars 2010 relatif à l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement, que ce risque ne peut être estimé et qu'il ne peut donc être exclu. Au vu de ces précédentes conclusions et de celles de l'avis de mars 2009 relatif aux nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale, il n'apparaissait pas urgent de suspendre, quand il y a lieu, ou de ne pas autoriser¹ les usages du nano-argent dans les biens de consommation, les ingrédients alimentaires et les matériaux en contact des denrées alimentaires.

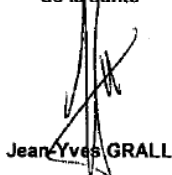
Nous souhaitons donc savoir si les travaux du BfR sont fondés sur des connaissances scientifiques nouvelles comparativement à vos expertises de 2009 et 2010.

A ce titre, en vous appuyant sur votre système de veille pour la thématique des nanotechnologies, nous vous demandons dans un premier temps, d'analyser les différences éventuelles, sur le plan bibliographique, entre le rapport du BfR et ceux de l'Anses datés de 2009 et 2010.

Si des différences majeures sont identifiées lors de cette première analyse, nous vous demandons d'analyser les avis et recommandations publiés par des instances d'expertise nationale ou internationale, y compris en milieu de travail, afin de mettre à jour votre expertise à la lumière de ces éventuelles connaissances nouvelles.

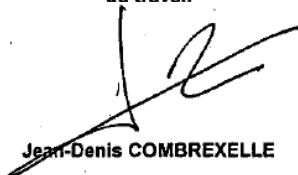
Nous vous remercions de bien vouloir nous indiquer dans les meilleurs délais les modalités et le calendrier de réponse à cette saisine.

Le Directeur général
de la santé



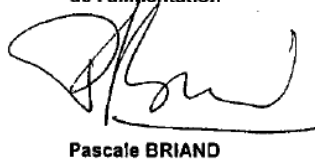
Jean-Yves GRALL

Le Directeur général
du travail



Jean-Denis COMBEXELLE

La Directrice générale
de l'alimentation



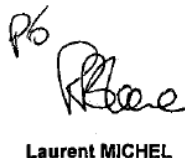
Pascale BRIAND

La Directrice générale de la
concurrence, de la consommation et de
la répression des fraudes



Nathalie HOMOBONO

Le Directeur général de la prévention des
risques



Laurent MICHEL

¹ En ce qui concerne les denrées alimentaires, l'argent est autorisé dans l'Union européenne en tant que colorant (additif E 174) pour l'enrobage de confiserie, la décoration de chocolat et les liqueurs. Il est prévu une réévaluation de l'argent (sous forme nanométrique ou non nanométrique) en tant qu'additif par l'AESA avant 2015 et l'appel à données déjà lancé comprend une demande d'information relative à la taille des particules. L'argent (et a fortiori le nano-argent) n'est pas dans les listes des vitamines et minéraux autorisés pour la fabrication de compléments alimentaires et l'adjonction aux denrées alimentaires. Toutefois, l'utilisation de nano-argent dans les matériaux au contact des denrées alimentaires reste possible.

Annexe 2 : Toxicologie — Tableaux de synthèse d'analyse bibliographique

Les références bibliographiques sont répertoriées dans le paragraphe 9 (p100) de ce rapport

A. Biodistribution / biocinétique des nanoparticules d'argent

Voie d'administration	Espèce	Ag	Dose, Durée d'exposition	Moment d'analyse	Rétention / élimination	Remarques	Référence
IV	Souris mâles et femelles	12 -20 nm	120mg/kg Unique	H6 à J14	Rate>foie>poumons> reins (femelle>mâles)	T1/2 sang sur 24 h 15,6h mâles et 29,9 h femelles	Xue, Zhang <i>et al.</i> (2012)
IV	Souris	9-16 nm	400 µg (environ) Unique	H24	Rate>foie>poumons>os>reins ND cerveau		Chrastina and Schnitzer (2010)
IV	Rat	20 et 200 nm	5mg/kg Unique	J1, J7 et J28	J1 :Foie>rate>reins>poumons>cerveau J7 : poumons>foie=rate>reins>cerveau J28 : reins>foie>rate>poumons=cerveau	-Accumulation cerveau augmente au cours du temps -Élimination et accumulation 20nm>200nm	Dziendzikowska, Gromadzka-Ostrowska <i>et al.</i> (2012)
IV	Rat mâles et femelles	20 et 100 nm	8µg- 6mg/kg /jour Répétée 28 jours		rate, poumons, reins, intestin, nœuds lymphatiques	Détection non quantitative	De Jong, Van Der Ven <i>et al.</i> (2013)
IV	Lapin, mâles	8 nm	0,5 et 5 mg/kg Unique	J1, J7, J28	Foie>reins=rate>poumons=testicules>cerveau Urine<< fèces	T1/2 sang 14 jours	Lee, Kim <i>et al.</i> (2013)

Voie d'administration	Espèce	Ag	Dose, Durée d'exposition	Moment d'analyse	Rétention / élimination	Remarques	Référence
IV	Souris gestantes	50-80 nm nitrate	0,4 et 0,73 mg/kg/jour Répétée 3 jours	J1 après 3 ^{ème} injection	Dans l'embryon, 0,008% de la dose injectée <0,1% dans cerveau Foie>rate=placenta>poumons Foie : 20% de la dose initiale, carcasse 10%, rate 1,5%	-Profil distribution NP et nitrate identique -33% de la dose administrée retrouvés dans les tissus mesurés	Austin, Umbreit <i>et al.</i> (2012)
IV	Rats mâles	20, 80 et 110 nm	83 µg/kg/jour Répété 5 jours	Après 1 ^{ère} injection : J1, 2, 3, 5, 6, 8, 11 et 17	A J17, 2-12% de la dose injectée retrouvée (13 à 55% à J2) Pas d'élimination du foie pour 110nm. A J2 environ 50% dans foie 20 nm J2 par organe foie>>reins>testicules>rate=poumons 110 nm J2 foie>>rate>poumons>reins>testicules	Effet taille sur rate, poumons, foi, et reins pas sur testicules, cerveau, cœur ou sang Accumulation grosses NP>petites	Lankveld, Oomen <i>et al.</i> (2010)
IP	Souris	Nanocristallin enrobage BSA	50 mg/kg Unique	J1, J4, J7	J1 : foie=rate>cœur>reins>poumons=cerveau J7 : foie>rate>reins>cœur>poumons=cerveau	Clairance rapide du cerveau. NP trouvés dans foie et rate (TEM), pas dans cerveau	Garza-Ocañas, Ferrer <i>et al.</i> (2010)
IP, IV	Souris mâles et femelles	Enrobage PVP 25 nm Ag+	22 et 108 µg/kg Répété 2 fois/sem, 4 sem	Accouplement à 4sem Embryons J14.5	Foie=rate, reins, cœur, poumons ND Foetus : foie, site majeur rétention (IP)	-rétention NP>Ag+ -rétention IP>>IV (100 fois) - Foetus : accumulation faible dose>forte dose -Placenta : dose-réponse respectée et NP>Ag+	Wang, Qu <i>et al.</i> (2013)

Voie d'administration	Espèce	Ag	Dose, Durée d'exposition	Moment d'analyse	Rétention / élimination	Remarques	Référence
IV	Souris mâles	Enrobage PVP 25 nm	1.3 mg/kg Répété 2 fois/sem, 4 sem	J1, 25, 64 après dernière injection	4mois : testicules=foie=rate>reins=cœur>poumon	-Diminution entre 1 et 64 jours d'environ 3 fois (foie, reins, rate)	Wang, Qu <i>et al.</i> (2013)
Inhalation	Souris mâles		2,8 mg/m ³ 6h (0,5 µg/g poumons)	T0 après expo puis H24	Cœur=poumons>rate>testicules>cerveau>foie	En 24h diminution d'Ag de 6 fois dans le cœur et 3,5 fois dans les poumons	Kwon, Minai-Tehrani <i>et al.</i> (2012)
Inhalation	Rats mâles et femelles	14nm	50, 120 et 380µg/m ³ 6h/j, 5j/sem, 12 sem	T0, 4 et 12 semaines	T0 : mâles foie>reins>rate=testicules T0 femelles faible dose foie=ovaires>reins>rate=cerveau T0 femelles forte dose : reins>foie>ovaires>rate>cerveau	-Dose réponse (accumulation) non respectée : poumons, cerveau, reins (femelles) -élimination totale 12 sem : foie, rate, reins -pas d'élimination cerveau (augmentation mâles) -élimination poumons importante	Song, Sung <i>et al.</i> (2013)
Inhalation	Souris mâles	10 nm	3.3 mg/m ³ 4h/j, 5j/sem, 2 sem	T0 et 3 sem	Quantité dans les poumons après exposition correspond à 4% de la quantité déposée (évaluation par calcul) Non détectable dans foie, cœur et cerveau	En 3 sem diminution d'Ag de 3 fois dans poumons	Stebounova, Adamcakova-Dodd <i>et al.</i> (2011)
Intra nasale	Souris mâles	25 nm	100 et 500 mg/kg unique	J1 et J7	Cerveau (bulbe olfactif), cavité nasale, rate, poumons pour quelques animaux	Détection non quantitative	Genter, Newman <i>et al.</i> (2012)
Aspiration oropharyngée	Souris, femelles	35nm et nanowires (3 à 28 µm)	0,5 à 2,5mg/souris Unique	J1	Détection dans les macrophages alvéolaires	Phagocytose frustrée pour fibres >14µm	Schinwald, Chernova <i>et al.</i> (2012)

Voie d'administration	Espèce	Ag	Dose, Durée d'exposition	Moment d'analyse	Rétention / élimination	Remarques	Référence
Orale	Rats mâles	20 nm sans coating 15 nm PVP AgNO ₃	90 mg/kg/j NP 9 mg/kg/j nitrate Répétée 28 jours	J1, J8, J56	Foie>rate>testicules>reins>cerveau>poumons clairance quasi complète à 56 jours Élimination lente du cerveau et des testicules Élimination fécale estimée à plus de 99% de la dose administrée en 1 semaine	-Pas d'effet coating sur la distribution/rétention -accumulation dans les organes nitrate>NP -élimination plus importante pour la dose plus faible	van der Zande, Vandebriel <i>et al.</i> (2012)
Orale	Rats mâles et femelles	15 et 25 nm	100 et 500 mg/kg Répétée 28 jours	T0, 1 mois, 2 mois et 4 mois	Rate>foie>reins>testicules Élimination lente du cerveau surtout pour dose faible et pas/peu d'élimination des testicules	T1/2 sang : 25> 10 nm, femelles>mâles T1/2 rate et reins 25>10nm T1/2 reins femelles>mâles	Lee, Kim <i>et al.</i> (2013)
Orale	Rats femelles	14 nm Ag citrate	9 mg/kg/j Répétée 28 jours	J1	Intestin >estomac>reins>foie>>cerveau (environ 100 fois moins que dans intestin) Élimination fécale 63% de la dose administrée en 24h	Accumulation citrate>NP Élimination fécale NP>citrate Profil distribution NP = citrate	Loeschner, Hadrup <i>et al.</i> (2011)
Orale	Rats mâles et femelles	56nm	30, 125 et 500 mg/kg Répétée 90 jours	T0	Faible dose : Testicules>foie>poumons>reins>>cerv eau Intestin chez les mâles Forte dose : reins>foie>poumons>testicules>>cerv au	-Foie, poumons (doses faibles) reins toutes doses) : Femelles>mâles -Dose-réponse non respectée : accumulation relative supérieure pour testicules à doses faibles, et pour les reins à dose forte	Kim, Song <i>et al.</i> (2010)

Voie d'administration	Espèce	Ag	Dose, Durée d'exposition	Moment d'analyse	Rétention / élimination	Remarques	Référence
Orale	Souris mâles et femelles	22, 42, 71 et 323nm	1 mg/kg Répétée 14 jours	T0	22nm:Cerveau=foie=poumons=reins=testicules 42nm:testicules=poumons>cerveau>foie>reins 71nm : foie>cerveau=reins>poumons testicules ND 323 nm : ND, tous organes	-rétention petites NP>grosses -profil de distribution varie en fonction de la taille	Park, Bae <i>et al.</i> (2010)
Orale (OCDE 407)	Rats mâles et femelles	60 nm	30mg/kg, 300mg/kg, 1000mg/kg Répétée 28 j	6 sem	Présence de NP dans la paroi de l'intestin grêle et le côlon aux doses les plus fortes		Jeong, Jo <i>et al.</i> (2010)
Orale intragastrique	Rats femelles	35 nm 110Ag-PVP	1.7 mg/kg unique	J1	Dans les fœtus : foie>> cerveau Total fœtus 0.08% de la dose administrée	évaluation d'Ag indirecte résultant d'un calcul basé sur l'activité mesurée (Bq) et non sur la masse d'Ag	Melnik, Buzulukov <i>et al.</i> (2013)

B. Toxicité aiguë

Administration	Schéma de traitement	Espèce /souche	nanoparticules d'argent	Mortalité	Poids corporel	Prise de nourriture et d'eau	Poids des organes	Paramètres hématologiques et biochimiques	Lavage broncho-alvéolaire	Examens macroscopique et histologique	Stress oxydant	Inflammation et Immunotoxicologie	Remarques	Référence
Gavage	2000 mg/kg, 1 seule adm	Rats mâles et femelles		0						→				Kim, Song <i>et al.</i> (2013)
Gavage	1.97	Souris	nanoparti		→	→								Han, Woo <i>et</i>

Administ ration	Schéma de traite ment	Espè ce /souc he	nanoparti cules d'argent	Mortali té	Poid s corp orel	Prise de nour riture et d'eau	Poids des organ es	Param ètres hémat ologiques et biochimique s	Lava ge bron cho-alvéo laire	Examens macroscopique et histologique	Stres s oxyd ant	Inflam mation et immunotoxico logie	Remarq ues	Référence
	ppm	s	cules d'argent sphérique s de 2-5 nm											<i>al.</i> (2012)
Gavage	5000 mg/kg, 1 seule adm, suivi pendant 14j	Souri s ICR mâles et femell es	10-20 nm	0	→			→ hémato logie						Maneewatta napinyo, Banlunara <i>et al.</i> (2011)
Gavage	10, 100 et 1000 mg/kg, 1 seule adm au 9e jour de gesta tion	Souri s CD1 femell es gesta ntes			→									Philbrook, Winn <i>et al.</i> (2011)
Inhalation (nose only)	2854µg/ m3 en moyenn e pendant 6h, 10 l/min, observat ion directe après expo ou 24h	Souri s mâles C57B L6	nanoparti cules d'argent de 20.3 nm en moyenne						→ activit é LDH, nb de cell total et leuco polynucléé s ;	→ poumons			Retour à la normale 24h après expo ; distributi on d'Ag dans poumon s, cœur, rate et testicule	Kwon, Minai- Tehrani <i>et al.</i> (2012)

Administ ration	Schéma de traite ment	Espè ce /souc he	nanoparti cules d'argent	Mortali té	Poid s corp orel	Prise de nour riture et d'eau	Poids des organ es	Param ètres hémat ologiques et biochimique s	Lava ge bron cho-alvéo laire	Examens macroscopique et histologique	Stres s oxyd ant	Inflam mation et Immun otoxico logie	Remarq ues	Référence
	après								↗ contenu en protéines, ↗ signaux MAPK dans poumons				s	
Inhalation aérosols	100 et 1000 µg/m3 Exposition pendant 5h ; observation 1 et 7 j après expo	Rats mâles							→ activité LDH, → albumine ; → comptages cellulaires sauf monocytes	→ poumons, cardiovasculaire			Effets pouvant être rapportés aux ions Ag libérés, dépend de la stabilité des sprays industriels	Roberts, McKinney <i>et al.</i> (2013)
Intranasale	100 et 500 mg/kg, observation 1 et	Souris C57B 1/6 mâles	nanoparticules d'argent 25 nm		→	→		→ hémoglobine		→ examen macro ; → cerveau, foie, reins, poumons ; → pulpe blanche, → pulpe rouge de la rate ; qq	↗ GSH dans épithélium			Genter, Newman <i>et al.</i> (2012)

Administ ration	Schéma de traite ment	Espè ce /souc he	nanoparti cules d'argent	Mortali té	Poid s corp orel	Prise de nour riture et d'eau	Poids des organ es	Param ètres hémat ologiques et biochimique s	Lava ge bron cho-alvéo laire	Examens macroscopique et histologique	Stres s oxyd ant	Inflam mation et Immun otoxico logie	Remarq ues	Référence
	7j après administ ration									érosions de l'épithélium nasal	nasal et sang ; → GSH dans cerve au, foie, reins, poum ons			
Instillation intratrach éale	50 et 250 µg, 1 seule adm, observat ion 24h après	Rats femell es	PVP-NPs- ag de 70 nm						Avec 50 µg : →; Avec 250 µg : ↗ activit é LDH, conte nu en protéi nes, cytoki nes, nb neutr ophile s				Internal isation dans les macroph ages alvéolair es	Haberl, Hirn <i>et al.</i> (2013)
Aspiration oro-	10.7 à 50	Souri s	nanoparti cules						→ activit	→poumons pour AgNW 3 ; AgNW 5 et 10 qqs			Accumul ation	Schinwald, Chernova <i>et</i>

Administ ration	Schéma de traiteme nt	Espè ce /souche	nanoparti cules d'argent	Mortali té	Poid s corporel	Prise de nourri ture et d'eau	Poids des organes	Param ètres hémat ologi ques et biochi mique s	Lava ge bron cho- alvéo laire	Examens macroscopique et histologique	Stres s oxydant	Inflam mation et immun otoxico logie	Remar ques	Référence
pharyngé e	µg/souris, observat ion 24h après administ ration	C57B 1/6	d'argent 35 nm, AgNWs 3 à 28 µm						é LDH, contenu en protéi nes, nb cellul es total; nb granu locyte s avec AgN W14	granulomes et infiltrats de lymphocytes ; AgNW14 ↑ granulomes et infiltrats de lymphocytes			d'AgNW s dans macro phages alvéolair es (phagoc ytose complète pour AgNW 3, 5 et 10 et partagée entre plusieurs cellules pour AgNW14)	al. (2012)
Aspiration oro- pharyngé e	0.1, 0.5 et 1 mg/kg, 1 seule adm, observat ion 40h puis 21 j après	Souris C57B 1/6 mâles	nanoparti cules d'argent cotées avec citrate de 20 et 110 nm						nb cellul es total, nb neutr ophile s et chem okine s après 40h ; ↑	↑ zones d'inflammation poumons après 40h ; ↑ contenu en collagène total des poumons, fibrose précoce après 21j (nanoparticules d'argent de 110 nm à 1 mg/kg)			Contenu en Ag dans les poumon s non différent entre les 2 nanos ; pas d'Ag détecté dans les autres organes	Wang, Ji et al. (2014a)

Administ ration	Schéma de traite ment	Espè ce /souc he	nanoparti cules d'argent	Mortali té	Poid s corp orel	Prise de nour riture et d'eau	Poids des organ es	Param ètres hémat ologi ques et biochi mique s	Lava ge bron cho- alvéo laire	Examens macroscopique et histologique	Stres s oxyd ant	Inflam mation et Immun otoxico logie	Remar ques	Référence
									facteur s de croiss ance TGF- beta1 et PDG F-AA après 21j (nano partic ules d'arg ent de 110 nm à 1 mg/kg)				sauf foie ; effets plus prononc és pour la NP-Ag de plus faible taille apr ès 40h ; effets plutôt avec la nano de 110 nm à la plus forte dose (1 mg/kg) ; toxicité non liée uniquem ent aux ions Ag ⁺	
Injection sous- cutanée	250 µl contena nt 0.35 mg d'Ag, 1 seule adm, observat ion 1 et	Souri s Balb/c femell es	nanoparti cules d'or (57 nm de long) avec une coque d'Ag							↘ reins (atteintes glomérulaires et de la filtration)		↗ reins	Accumul ation d'Ag dans le rein détectée après 28j	Meng, Ji <i>et al.</i> (2014)

Administ ration	Schéma de traite ment	Espè ce /souc he	nanoparti cules d'argent	Mortali té	Poid s corp orel	Prise de nour riture et d'eau	Poids des organ es	Param ètres hémat ologiques et biochimique s	Lava ge bron cho-alvé olaire	Examens macroscopique et histologique	Stres s oxyd ant	Inflam mation et immunotoxico logie	Remarq ues	Référence
	8 j après													
Injection sous- cutanée	1.97 ppm	Lapins	nanoparti cules d'argent sphériques de 2-5 nm							→ peau (érythème, œdème, escarre)				Han, Woo <i>et al.</i> (2012)
Cutanée	100, 1000 µg/ml	Cobayes mâles								Peau : rétrécissement épiderme et couche papillaire, inflammation				Korani, Rezayat <i>et al.</i> (2013)
IP	1000 et 500 mg/kg, observat ion entre J1 et J30 après ip	Rats SD mâles	nanoparti cules d'argent 22 nm	20% à 30j après ip de 1000mg/kg ; 0% à 500 mg/kg				ALT sérique (↑J1 et J4 puis ↓ J30); → bilirubi ne sérique à J30 ; Foie : ↓ conten u en ATP		Foie : à J4-7 qqs foyers de cellules inflammatoires, à J10, foyers de dégénérescence et d'infiltration modérée de cellules inflammatoires ; à J30, dégénérescence proéminente avec nécrose et inflammation chronique ; ↑ apoptose ; induction de structures d'autophagie			Ag dans foie autour des vaisseaux sanguins (surtout entre J4 et J7)	Lee, Liu <i>et al.</i> (2013)
IV	4, 10, 20, et 40 mg/kg	Rats						↑ ALT, ASP, ALP, GGTP, bilirubi			↑ ERO sérum à 40		Dépôt de particules à 40 mg/kg	Tiwari, Jin <i>et al.</i> (2011)

Administ ration	Schéma de traite ment	Espè ce /souc he	nanoparti cules d'argent	Mortali té	Poid s corp orel	Prise de nour riture et d'eau	Poids des organ es	Param ètres hémat ologi ques et biochi miques	Lava ge bron cho-alvé olaire	Examens macroscopique et histologique	Stres s oxyd ant	Inflam mation et Immun otoxico logie	Remarq ues	Référence
								ne sérique à 40 mg/kg			mg/kg			
IV	5 et 10 mg/kg (20 nm) ; 5 mg/kg (200 nm)	Rats Wista r	nanoparti cules d'argent de 20 et 200 nm		→	→	→ testicu les mais ↗ index gonad o- somati que							Gromadzka- Ostrowska, Dziendzikow ska <i>et al.</i> (2012)
IV	7.5, 30 et 120 mg/kg, observat ion à 7 et 14j après injection	Souri s ICR		Mort en 30h après injectio n de 200 mg/kg (oedem es poumo ns et foie)	→		→	→para mètres à 120 mg/kg ; avec 7.5 et 30 mg/kg : ↗LDH à J7, ↘albu mine et TP à J7, GOT à J7, →GPT, ALP, CRE,		Chez qqs animaux, poumons décolorés, foie plus foncé et léger œdème ; Poumon : à J7 infiltration de cellules inflammatoires, ↘paroi alvéolaire, Foie : pas d'inflammation, oedème et perte cytoplasmique à 120 mg/kg ; → cerveau, cœur, rate, reins, testicules, ovaires				Xue, Zhang <i>et al.</i> (2012)

Administ ration	Schéma de traite ment	Espè ce /souc he	nanoparti cules d'argent	Mortali té	Poid s corp orel	Prise de nourri ture et d'eau	Poids des organ es	Param ètres hémat ologiq ues et biochi mique s	Lava ge bron cho- alvéo laire	Examens macroscopique et histologique	Stres s oxyd ant	Inflam mation et Immun otoxico logie	Remarq ues	Référence
								T-CHO						
IV	24µg/ani mal, observat ion 24h après injection	Souri s C57Bl /6 femell es	nanoparti cules d'argent (NM 300)					→ albumi ne hépatiq ue				Foie : ↗TNF-α et IL10, →IL2, IL4 et IFN gamma		Kermanizad eh, Chauché <i>et al.</i> (2013)
IV	5 mg/kg, observat ion à 1, 7 et 28j après injection	Rats mâles Wista r	nanoparti cules d'argent de 20 et de 200 nm, sphérique s							nanoparticules d'argent et clusters dans rate : pulpes rouge et blanche (dans cytoplasme) ; rein : toutes les régions du mais accumulation préférentielle dans les tubules, dans cytoplasme, mitochondries et vacuoles du tissu interstitiel ; poumon : cytoplasme, mitochondries et noyaux des macrophages (alvéolaires et dans interstitium) ; foie : cellules endothéliales et de Kuppfer (cytoplasme, mitochondries, membranes) ; cerveau			Même distributi on dans les organes en fonction du temps même si accumul ation + importan te avec le temps	Dziendzikow ska, Gromadzka- Ostrowska <i>et al.</i> (2012)

Toxicité subchronique

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- riture et d'ea- u	Poids des organ- es	Param- ètres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
Gavage			PVP nanopar- ticules d'argent <20 et < 15 nm	0	→		→	→ AST et ALT dans sang						van der Zande, Vandebr- iel <i>et al.</i> (2012)
Gavage	12.6 mg/kg, pendan- t 28 j	Rats fem- elles Wist- ar Han- nove- r Gala- s	nanopar- ticules d'argent 14 nm							Ileum : présence d'Ag dans la lamina propria, surtout en haut des villosités ; pas d'Ag dans le cytoplasme des cellules épithéliales ; granules dans lysosomes des macrophages de la lamina propria et lame basale, dans tissu connectif de la sous muqueuse ; granules composés d'Ag avec soufre et sélénium, comme avec Ag acetate ; foie : dépôt d'Ag variable selon les animaux, marquage intense au niveau de veine centrale et du tractus portal, qqs dans cellules de Kuppfer, marquage proche des hépatocytes mais pas de distinction à l'intérieur ou dans canalicules biliaires ; reins : localisation de gros granules au niveau de bordure en brosse de l'épithélium des tubules proximaux, marquage plus homogène des glomérules, fort marquage dans tissu interstitiel				Loeschn- er, Hadrup <i>et al.</i> (2011)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- riture et d'ea- u	Poids des organ- es	Paramè- tres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
Gavage	30, 125 et 500 mg/kg, 13 semain- es	Rats mâles et femel- les	nanopar- ticules d'argent 56 nm		↘ dose dépendante mâles ; → femel- les	→ femel- les	↘ testicules (mâles 500 mg/kg); reins (femelles 30 et 125 mg/kg); → autres organes							Kim, Song et al. (2010)
Gavage	100 et 500 mg/kg/j pendant 4 semain- es, 1 fois/jour , 7 jours/se- maine	Rats Sprague Dawley mâles et femel- les	nanopar- ticules d'argent colloidal à 10 et 25 nm					→ la plupart des paramè- tres ; ↗ cholestérol chez mâles ; ↗ AST et ALT dans sang surtout chez femelles		gouttelettes lipidiques dans foie ; régénération tubulaire dans rein		infiltration de cellules inflammatoires dans le foie	effets non dose- dépendants	Lee, Kim et al. (2013)
Gavage	62.5, 125 et	Rats	citrate- nanopar		→	→	→	→		→ histologie des organes ↗ alopecie				Hong, Kim et

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Paramè- tres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
	250 mg/kg pendan- t 42 jours aux mâles et 52 jours aux femelle- s (2 semain- es avant l'accou- plemen- t puis tout le long de la gestatio- n et pendan- t 4 jours de lactatio- n)		ticules d'argent 7.9 nm											<i>al.</i> (2014)
Gavage	500 mg/kg/j pendan- t 81j	Rats mâle- s	Collargo- l		↘	↘	→	dans plasma : ↗ cholestér- ol total et			↗ dan- s foie et	↗ IL6 et TNF-α dans foie		Ebabe Elle, Gaillet et <i>al.</i> (2013)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- riture et d'ea- u	Poids des organ- es	Param- ètres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
								cholestér- ol-LDL ; ↘ triglycé- rides ; → capacité s antioxyd- antes ; ↗ ALT sérique			cœ- ur ; →M DA et SO D hépa- tiq- ues			
Gavage	2.25, 4.5 et 9 mg/kg, 28 j, urine collecté- e après 18 j	Rats Wist- ar Han- nove- r Gala- s	PVP- nanopa- rticules d'argent		→			→créatin- ine					chez les femelles ↗ acide urique et allantoïne dose dépenda- nte ; différenc- e de profils métabolo- miques entre les 2 sexes	Hadrup, Lam <i>et al.</i> (2012)
Gavage	30, 300 et 1000 mg/kg, 28j	Rats SD	nanopa- rticules d'argent 60 nm							↗ mucus, nb de cellules à mucus			↗ dose dépenda- nte d'Ag dans lamina propria du petit	Jeong, Jo <i>et al.</i> (2010)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Paramè- tres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remarq- ues	Référen- ce
													et gros intestin	
Gavage	0.25, 0.5, 1 et 2 mg/kg pendan- t 30j	Rats	nanopar- ticules d'argent 70 nm							Altérations histo observées dans poumons à 1 et 2 mg/kg				Sardari, Zarchi et al. (2012)
Gavage	0.25, 0.5, 1 et 2 mg/kg pendan- t 30j	Rats	nanopar- ticules d'argent 70 nm							Altérations histo dans foie, rate et reins à 1 et 2 mg/kg				Sardari et al. 2012
Gavage	50, 100, 250, 500 et 1000 mg/kg pendan- t 2 semain- es	Rats SD	nanopar- ticules d'argent (Cat. No. 576832)		→		→ foie	→ AST, ALT et ALP sériques					→ activités CYP 1A, 2C, 2D, 2 ^{E1} et 3A hépati- ques; pas de différenc- e de niveau en Ag dans foie entre contrôles et traités ; pas d'observ- ation de	Kulthong , Manirata nachote et al. (2012)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Paramè- tres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remarq- ues	Référen- ce
													particules d'Ag dans foie	
Gavage	5, 10, 15 et 20 mg/kg pendan- t 21 j	Sour- is Swis- s albin- os mâle- s	nanopa- rticules d'argent de 3 à 20 nm, forme ovale à sphériq- ue		\dès 14j de traite- ment	→				Intestin à 10mg/kg : perte des microvillosités, élargissement de la lamina propria, ↑ figures mitotiques dans les glandes (remplacement des cellules épithéliales		↑ nb de cellules inflamma- toires dans lamina propria de l'intestin	nanoparti- cules d'argent présente- s dans les différente- s couches de l'intestin ainsi que dans les microvillo- sités cassées	Shahare and Yashpal (2013)
Orale par boisson	4, 8 et 12ppm, pendan- t 42 j	Poul- ets	Aucun élément sur ce point	4% à 12 ppm (1,8 % pour lot contr- ôle)	\	\	↑ intesti- n, grai- sse abdo- minale ; → gizzar- d, foie						↑ Ag dans muscle, fémur, foie et fecès	Ahmadi and Rahimi (2011)
Orale par aliment- ation	5, 10 et 15 ppm/kg , pendan-	Poul- ets	Aucun élément sur ce point								↑ MD A, GS H et		↑ Ag dose- dépend- ante dans muscle>	Ahmadi (2012)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Param- ètres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
	t 42 j										cata- lase dan- s érth- rocy- tes ; ↘ SO D		rate>foie >pancrea- s>cœur> reins>po- mons>f- eces>bo- urse de Fabricius	
Orale par boisson	Donnée s peu claires sur le traitem- ent, pendan- t 14 j ?	Poul- ets	Aucun élément sur ce point	0	Faible ↘								↗ Ag dans colon, reins et foie	Chauke and Siebrits (2012)
Orale par boisson	4, 8 et 12 ppm pendan- t 42 j	Poul- ets Ross 308	nanopar- ticules d'argent 13 nm (Nanoci- d L2000)							Foie 4 ppm : cell swelling des hépatocytes et hypérémie ; 8 et 12 ppm : dilatation au niveau de la veine centrale et + hyp^érémie + changements lipidiques ; 12 ppm : ↗ tissu connectif (fibroplasie) et nécrose focale des hépatocytes ; ↗ cellules en apoptose à 8 et 12 ppm				(Loghma- n, Iraj et al. 2014)
Inhalati- on (en chambr- e)	48, 117 et 381 µg/m3 pendan- t 12 semain		nanopar- ticules d'argent < 47 nm										effets toxiques peu sévères car- gènes	Dong, Choi et al. (2013)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Paramè- tres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
	es, 5j/sema- ine, 6h/j												impliqués dans système redox, inflamma- tion, cycle cellulaire et apoptose non altérés dans les reins ; différenc- e d'accumu- lation entre mâles et femelles pouvant être due à des transport- eurs ou des protéines de liaison différentes	
Instillati- on intratrachéale	3.5 et 17.5 mg/kg, tous les		52 nm en moyenn- e						↑ IL6 et TNF-α		↓ Cap- acités			Liu, Yang et al. (2013)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Paramè- tres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
	2 jours pendan- t 5 semain- es										anti- oxy- dant es ↑N O et MD A d- ans LBA			
Chambr- e d'inhalat- ion	0.6, 1.4 et 3 x 10 ⁶ particul- es/cm ³ , 5 j/semai- ne, 6h/j pendan- t 12 semain- es, 4 et 12 semain- es après expositi- on	Rats SD mâle s et feme- lles	nanopa- rticules d'argent sphériq- ues entre 4 et 47 nm de diamètr- e	0	→	→		↓ paramètr- es respirato- ires chez les mâles ; → chez les femelles				↑ inflamma- tion alvéolaire dans poumons ; accumula- tion de macroph- ages ; ↓ pendant la période de récupérat- ion mais inflamma- tion restant persistan- te chez les mâles	↑ dose dépendan- te de la concentra- tion en Ag dans les poumons et dans tous les organes testés (sauf cerveau des femelles) puis ↓ pendant la période de récupérat- ion sans	Song, Sung et al. (2013)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Paramè- tres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
												à la forte dose	élimination complète dans poumons , foie et rate ; ↗ dans rein x5 chez femelles /mâles	
Chambre d'inhalation	3.3 mg/m ³ , 4h/j, 5j/semaine pendant 2 semaines, 1h et 3 semaines après exposition	Souris mâles C57 Bl/6	nanopar- ticules d'argent 10 nm						↗nb cellules total, nb neutrophiles ; → activité LDH, contenu en protéines,	→ poumons		→ inflamma- tion pulmonaire	Internalisation dans les phagosomes des macrophages ; ↗Ag dans poumons et LBA ; cœur, foie, reins < LOD	Stebounova, Adamcaková- Dodd <i>et al.</i> (2011)
Chambre d'inhalation	0.6, 1.4 et 3 x 10 ⁶ particules/cm ³ , 5 j/semaine, 6h/j	Rats SD mâles et femelles	nanopar- ticules d'argent sphériques entre 6 et 55 nm de	0 (1 mort à la forte dose pendant exa	→	→	→	→ pas d'effet dose dépendant sur hématologie et paramètres		Hyperplasie des canaux biliaires à la forte dose chez les 2 sexes ; pas d'effet sur le tractus nasal ; pas d'effets sur rein ni sur cœur		↗ inflamma- tion alvéolaire dans poumons ; accumu- lation	Accumulation dose dépendante dans poumons , foie, sang,	Sung, Ji <i>et al.</i> (2009)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Param- ètres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
	pendan- t 13 semain- es		diamètr- e	men- opht- almo-)				es biochimi- ques				de macroph- ages à la forte dose chez les 2 sexes	bulbe olfactif et cerveau ; plus d'accumu- lation dans les reins des femelles que des mâles (x2 à 3) ; pas d'altérati- on de la fonction rénale (sauf chez les mâles à la plus forte dose)	
Chambr- e d'inhalat- ion	0.6, 1.4 et 3 x 10 ⁶ particul- es/cm ³ , 5 j/semai- ne, 6h/j pendan- t 13 semain- es	Rats SD mâle s et feme- lles											Même données que Sung et al 2009 ; dépôt dose dépenda- nt dans sang, estomac, cerveau,	Kim, Sung et al. (2011)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Param- ètres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
													foie, reins, poumons et testicules	
Cutané- e	50µl d'une solution à 10 ppm sur blessur- e cutané- e de 10 mm, 1 fois/j pendan- t 2 semain- es, observ- ation à 2, 7 et 14j de traitem- ent	Sour- is BAL- B/c fem- elles	nanopa- rticules d'argent < 30 nm							Foie : à J2, dilatation au niveau de la veine centrale et hyperémie + ↗ cellules de Kupffer et inflammatoires ; à J7, en plus, perte d'arrangement radial des hépatocytes, cell swelling ; à J14, changements lipidiques dans qqs hépatocytes				(Heydar- nejad, Yarmoh- ammadi- Samani et al. 2014)
Cutané- e	100, 1000 et 10 000 µg/ml, 5j/sema- ine pendan	Cob- ayes mâle- s								Peau : rétrécissement épiderme, derme, couche papillaire, inflammation ; foie : nécrose et ↗ cellules de Kupffer ; rate : atrophie pulpe blanche et inflammation pulpe rouge				Korani, Rezayat et al. (2013)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Param- ètres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
	t 13 semain- es													
Cutané- e	21 semain- es, applicat- ion sur un panse- ment			0	→		↑foie, reins	→ hématol- ogie; ↑ ALT sérique						Bidgoli, Mahdavi et al. (2013)
Cutané- e	500µl d'une solution de 0.34 à 34 µg/ml, 1 adm- topique avec occlusi- on par panse- ment /j pendan- t 14 j	Porcs (Sus- scrofa) femelles	nanopar- ticules d'argent de 20 nm, washed et unwash- ed							Peau, observation macroscopique: pas d'érythème ni d'œdème (test de Draize)		Pour les 2 nanopar- ticules d'argent, observati- on microsco- pique montrant des effets dose dépendan- t avec œdème épidermi- que et inflamma- tion dermique ; effets	nanopar- ticules d'argent résiduelle- s à la surface de la peau ; détection nanopar- ticules d'argent dans les couches superfici- elles (stratum corneum)	Samberg, Oldenburg et al. (2010)

Admini- stration	Sché- ma de traitem- ent	Esp- èce /sou- che	nanopa- rticules d'argen- t	Mort- alité	Poids corpo- rel	Prise de nour- ritur- e et d'ea- u	Poids des organ- es	Paramè- tres hématol- ogiques biochim- iques et physiol- ogiques	Lavage broncho- alvéolair- e	Examens macroscopique et histologique	Stre- ss ox	Inflam- et Immunot- ox	Remar- ques	Référen- ce
												typiques d'irritatio- n chroniqu- e		
IV	Jusqu'à 6 mg/kg, 28 jours, 1 fois/j 100 nm unique- ment testée à 6 mg/kg	Rats mâle s et femelle s	nanopar- ticules d'argent de 20 et 100 nm		↘ chez mâles et femelle s à 6 mg/kg pour les 2 nanos ; ↘ chez mâles pour des dose s plus faible s		↑foie, thymu- s, rate ; → cœur, reins, cerveau, testicu- les, épidid- yme, adren- als			élargissement et une coloration brune de la rate et du foie, de même pour les nodules lymphatiques à la plus forte dose				De Jong, Van Der Ven et al. (2013)
IV	0.4 et 0.73 mg Ag/kg/j pendan- t 3 jours (jours 7, 8 et 9 de	Sour- is CD- 1 gest- ante s	nanopar- ticules d'argent 50 nm							→ cerveau, cœur, foie, reins, poumons, rate, endomètre, placenta				Austin, Umbreit et al. (2012)

Admini stration	Sché ma de traitem ent	Esp èce /sou che	nanopa rticules d'argen t	Mort alité	Poids corpo rel	Prise de nour ritur e et d'ea u	Poids des organ es	Paramè tres hématol ogiques biochim iques et physiol ogiques	Lavage broncho- alvéolair e	Examens macroscopique et histologique	Stre ss ox	Inflam. et Immunot ox	Remarq ues	Référen ce
	gestatio n)													

Annexe 3 : Toxicité et génotoxicité des nanoparticules d'argent

1 Toxicité in vitro

Dans le rapport sur l'évaluation des risques des nanomatériaux « *Nanomatériaux et produits de consommation* » publié par l'Anses en mars 2010, les études disponibles ont utilisé des cellules de diverses origines, souvent peu représentatives d'une exposition humaine. Depuis, de nombreux articles ont été publiés également sur systèmes d'essai *in vitro* très divers.

Le niveau de cytotoxicité induit par les nanoparticules d'argent dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels la nature même des nanoparticules testées (taille, présence d'un revêtement,...), le système d'essai mis en œuvre (type cellulaire, conditions de culture,...), le schéma de traitement (concentration, durée,...) et le paramètre utilisé pour mesurer la toxicité.

1.1 Cellules immunitaires

Yen *et al.* (Yen, Hsu *et al.* 2009) ont étudié la cytotoxicité induite sur des macrophages murins (cellules J774 A1) par des nanoparticules d'argent de 3 tailles différentes (2 à 4 nm, 5 à 7 nm, 20 à 40 nm) en mesurant la prolifération cellulaire après 24, 48 et 72 heures de traitement à 1 et 10 ppm. Les auteurs montrent qu'une diminution significative de la prolifération cellulaire apparaît uniquement à la concentration forte de 10 µg/ml après 48 et 72 heures de traitement.

Des effets cytotoxiques (blocage des cellules en G2/M ou S, stress oxydant et apoptose) sur cellules Jurkat T (lignée de lymphocytes T humains) ont été observés plus largement avec des nanoparticules d'argent qu'avec les ions Ag⁺. Des études en temps et concentration ont été réalisées (Eom and Choi 2010). Sur des cellules épithéliales pulmonaires, une cytotoxicité plus importante des ions Ag⁺ a été observée (Cronholm, Karlsson *et al.* 2013).

Ghosh *et al.* (2012) ont également évalué la toxicité de nanoparticules d'argent (90 à 180 nm) *in vitro* sur lymphocytes humains à des concentrations allant de 25 à 200 µg/ml. Différentes méthodes ont été utilisées (bleu de Trypan, MTT, WST et Annexine V / Iodure de propidium pour détermination apoptose/nécrose). Comme attendu, les résultats montrent des niveaux de cytotoxicité dose-dépendant et variables selon le paramètre évalué (diminution de la survie dès 150 µg/ml par la méthode au bleu de Trypan, et dès 25 et 50 µg/ml respectivement par la technique au MTT et au WST). Les essais à l'Annexine V indiquent qu'un faible pourcentage de cellules entre en apoptose alors qu'une augmentation significative du nombre de cellules nécrotiques est notée dès 25 µg/ml.

1.2 Cellules souches

L'étude de Hackenberg *et al.* (2011) a évalué la mort cellulaire, les lésions de l'ADN et la déficience fonctionnelle induites par des nanoparticules d'argent vis-à-vis de cellules souches mésenchymateuses humaines isolées à partir de tissu adipeux de huit patients. Ces cellules ont été exposées à des concentrations finales de 10, 1 et 0,1 µg/ml de nanoparticules d'argent (< 50 nm - Sigma-Aldrich) pendant 1, 3 et 24 h. La cytotoxicité a été mesurée par le test d'exclusion au bleu trypan et le test au diacétate de fluorescéine, permettant de calculer le pourcentage de survie (nombre de cellules vivantes / nombre total de cellules) et la génotoxicité a été évaluée par le test des comètes et le test d'aberration chromosomique. Parallèlement, la libération de cytokines IL-6, IL-8 et de VEGF a été mesurée uniquement pour le temps 24 heures de traitement.

Des effets cytotoxiques significatifs ont été observés à la concentration maximale de 10 µg/ml dès 1 h de traitement, quelle que soit la méthode utilisée. Alors que l'exposition à 1 µg/ml de nanoparticules d'argent a induit une augmentation de la libération d'IL-6 et de VEGF, la sécrétion est inhibée à 10 µg/ml. Les taux d'IL-8 ont également augmenté aux concentrations de 0,1 et 1 µg/ml sans être statistiquement significatifs, mais ont diminué à 10 µg/ml. D'après les auteurs, ces effets indiquent l'activation des cellules souches. Les potentiels cyto- et génotoxique de ces

nanoparticules d'argent vis-à-vis de cellules souches mésenchymateuses humaines surviennent à des concentrations beaucoup plus élevées par rapport aux niveaux efficaces antimicrobiens.

1.3 Cellules pulmonaires

Foldberg *et al.* (2011) ont évalué la cytotoxicité de nanoparticules d'argent (30 à 50 nm de diamètre avec enrobage de 0,2 % de PVP) sur des cellules alvéolaires humaines A549 par la technique au MTT (mesure de la fonction mitochondriale). Les cellules ont été exposées pendant 24 heures (avec ou sans pré-traitement avec 10 mM de N-acétylcystéine, NAC) à des concentrations allant de 0 à 20 µg/ml de nanoparticules d'argent ou de 0 à 10 µg/ml d'Ag⁺ sous forme de AgNO₃. Les résultats indiquent que les niveaux de cytotoxicité entre nanoparticules d'argent et Ag⁺ sont similaires. Un prétraitement avec la NAC, un antioxydant, permet de réduire significativement la cytotoxicité confirmant l'implication des ERO. La méthode à l'Annexine V a donné des données très comparables à celles du MTT. Les auteurs ont conclu que la mort cellulaire était principalement due à une augmentation dose-dépendante de nécrose et d'apoptose tardive à des concentrations comprises entre 2,5 et 15 µg/ml de nanoparticules d'argent.

Pour déterminer à quel degré les nanoparticules d'argent et les ions Ag⁺ induisent la production d'ERO, des cellules alvéolaires humaines A549 ont été traitées soit avec des suspensions de nanoparticules d'argent ou avec les surnageants de suspensions de nanoparticules d'argent (présence exclusive d'ions Ag) correspondant à des concentrations de 1, 2 et 3 µg/ml en Ag total (Beer, Foldbjerg *et al.* 2012). Trois lots différents de nanoparticules d'argent (30 à 50 nm avec enrobage de 0,2 % de PVP) donnant des concentrations en ions Ag⁺ variables ont été testés comparativement à des suspensions colloïdales de nanoAg. La cytotoxicité sur cellules A549 a été déterminée par les méthodes au MTT et WST-8 ainsi que par l'analyse du cycle cellulaire après 24 heures de traitement. Parallèlement, l'induction d'apoptose/nécrose (méthode à l'Annexine V / Iodure de propidium) et la production d'ERO (sonde DCF-DA) ont été étudiées. Les résultats confirment que la cytotoxicité des nanoparticules d'argent dépend fortement de la concentration en ions Ag. Il est très intéressant de noter qu'aucune différence n'est observée entre les niveaux de cytotoxicité des suspensions de nanoparticules d'argent et ceux des surnageants de suspensions de nanoparticules d'argent. La même observation est faite concernant l'induction d'apoptose et de nécrose et pour l'analyse du cycle cellulaire. En revanche, les surnageants de suspensions de nanoparticules d'argent induisent entre 2,6 et 6 fois plus d'ERO que les suspensions de nanoparticules d'argent, ce qui suggère que la production d'ERO est principalement due à la présence d'ions Ag. Cette étude confirme que les ions Ag libres jouent un rôle majeur dans la toxicité des nanoparticules d'argent. Un effet combiné entre les nanoparticules et les ions Ag semble apparaître pour les plus faibles.

1.4 Cellules hépatiques

Des cellules humaines d'origine hépatique HepG2 ont été traitées pendant une période de 24 heures en absence d'activation métabolique avec une gamme de concentrations de 0,1 à 3 µg/ml de nanoparticules d'argent (7 à 10 nm), avec ou sans cystéine comme substance antioxydant (Kawata, Osawa *et al.* 2009). Parallèlement, des essais ont été réalisés avec AgCO₃ (ions Ag⁺). La CL 50 estimée pour les nanoparticules d'argent d'après la méthode au rouge neutre est de 2,5 µg/ml alors qu'aucune cytotoxicité n'a été notée pour les ions Ag⁺ ou pour les nanoparticules d'argent en co-traitement avec la cystéine, ce qui tend à démontrer un mécanisme d'action toxique exclusivement de nature oxydante.

Gaiser *et al.* (Gaiser, Hirn *et al.* 2013) ont étudié l'activité cytotoxique de nanoparticules d'argent (JRC NM-300) *in vitro* sur cellules C3A⁶², cellules dérivant de la lignée Hep G2 elle-même originaire d'une tumeur hépatique humaine. Au cours de cette étude, une CL 50 d'environ

⁶² La lignée cellulaire C3a, dérive par clonage de la lignée Hep G2 et est originaire d'une tumeur hépatique humaine. Ces cellules possèdent un grand nombre des caractéristiques phénotypiques et génétiques des cellules de foie humain normal.

20 µg/cm² a été déterminée par la méthode au bleu Alamar (test mesurant l'ATP par fluorescence) après 24 heures de traitement alors que par la technique au lactate déshydrogénase (LDH, marqueur d'intégrité membranaire), la CL 50 est de 2,5 µg/cm². Dans une précédente étude, Gaiser *et al.* (2012) ont étudié l'activité cytotoxique de nanoparticules d'argent (*Nanostructured and Amorphous Materials*, 35 nm) *in vitro* sur des hépatocytes primaires de truite et sur des cellules C3A. Au cours de cette étude, les nanoparticules d'argent se sont révélés plus cytotoxiques que le micro-Ag (0,6 à 1,6 µm) dans la lignée cellulaire C3A, avec l'apparition d'une cytotoxicité significative à partir de 62,5 µg/ml et des CL 50 respectives de 50 à 300 µg/ml. Il est intéressant de noter que les nanoparticules d'argent sont nettement moins cytotoxiques sur les hépatocytes primaires avec une CL 50 estimée à 1 000 µg/ml.

Cette étude confirme les résultats de Hussain *et al.* (2005) obtenus pour des nanoparticules d'argent de 100 et 15 nm avec des CL 50 calculées respectives de 24 et 50 µg/ml sur des cellules BRL 3A (fibroblastes hépatiques de rat) traitées pendant 24 heures. Les études de Kermanizadeh *et al.* (2012) réalisées sur des cellules C3A exposées à des nanoparticules d'argent (JRC NM-300 ; < 20 nm, revêtues de polyoxylaurate/Tween 20) ont conduit à l'obtention d'une CL 50 plus faible, de 2 µg/cm² par la méthode utilisant le WST 1.

1.5 Cellules rénales

Des nanoparticules d'argent (JRC NM300 ; < 20 nm, revêtues de polyoxylaurate/Tween 20) ont également été testées sur cellules épithéliales rénales humaines immortalisées HK-2 (Kermanizadeh, Vranic *et al.* 2013). Les cellules ont été exposées pendant 24 h afin d'estimer la cytotoxicité (méthode de viabilité cellulaire au WST-1) et l'induction d'inflammation (IL-6, IL-8, TNF-α et MCP-1) ou pendant 4 h pour évaluer l'oxydation (méthode au dihydroéthidium spécifique de la production d'ions superoxydes) et la génotoxicité (test des comètes modifié par l'ajout de FPG).

Les résultats ont permis de calculer des CL 50 de 10 et 4,5 µg/cm², respectivement dans les milieux K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium avec 2 % de protéines) et RPMI-FCS (10 % de protéines), après 24 h de traitement et ont mis en évidence une augmentation significative de la production d'IL-8 et d'IL-6.

1.6 Cellules intestinales

La diminution de la viabilité des cellules épithéliales humaines de colon HT29 (et de macrophages murins J774A.1) en réponse aux nanoparticules d'argent est dépendante de la dose (Nguyen, Seligy *et al.* 2013) mais aussi de la présence ou non d'un revêtement. Les nanoparticules d'argent nues affectent la viabilité pour des concentrations de 1 µg/ml d'argent, tandis qu'un tel effet ne commence qu'à 25 µg/ml pour des nanoparticules d'argent enrobées. Les altérations au niveau cellulaire incluent des modifications telles que rétrécissement cellulaire, déformation et gonflement des mitochondries. Les 2 types de nanoparticules d'argent (nues ou revêtues) sont visibles à l'intérieur des cellules sur des images MET. Pour les nanoparticules d'argent enrobées de même taille, un revêtement PVP induit une perte plus importante de viabilité comparée à un revêtement citrate, indiquant que la toxicité dépend également du type de revêtement de surface. Pour des concentrations d'argent équivalentes, les nanoparticules d'argent nues montrent une plus grande toxicité que l'AgNO₃, suggérant que la dissolution de l'Ag ne peut pas être le seul facteur contribuant aux effets induits par les nanoparticules d'argent nues. À l'inverse, les nanoparticules d'argent revêtues sont moins toxiques que l'AgNO₃ pour des concentrations d'argent équivalentes, suggérant que les revêtements peuvent avoir des effets protecteurs sur la libération d'ions Ag⁺ ou que le mécanisme de toxicité des nanoparticules d'argent diffère du matériel de taille micrométrique (Nguyen, Seligy *et al.* 2013).

1.7 Cellules cutanées

Samberg *et al.* (2010) ont cherché à évaluer la cytotoxicité et le potentiel inflammatoire de diverses nanoparticules d'argent vis-à-vis de la lignée de kératinocytes épidermiques humains HEK. Dans cette étude, 8 nanoparticules d'argent différentes ont été testées (nanoparticules non revêtues

lavées ou non lavées de diamètre 20, 50 et 80 nm, ainsi que des nanoparticules recouvertes de carbone, de diamètre 25 et 35 nm). Les propriétés des nanoparticules utilisées sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Propriétés des nanoparticules d'argent utilisées dans la publication de Samberg et al. (2010).

Description des nanoparticules d'argent	MDD (nm)	Diamètre par DLS (nm) ^a	Diamètre par MET (nm) ^a	Concentration (mg/mL)	Concentration en particules (particules/mL) ^a	Potentiel Zêta ^b (mV)
Colloïdales, non lavées	20	30,8 ± 0,6	22,4 ± 2,6	0,2	2,41 × 10 ¹²	- 29,7
	50	47,7 ± 0,5	49,4 ± 6,2	0,2	4,44 × 10 ¹¹	- 27,8
	80	75,5 ± 1,0	79,2 ± 8,0	0,2	7,09 × 10 ¹⁰	- 33,2
Colloïdales, lavées	20	25,5 ± 0,4	21,4 ± 3,1	2,86	1,89 × 10 ¹⁴	- 46,0
	50	43,7 ± 1,1	50,0 ± 5,9	3,45	5,01 × 10 ¹²	- 44,3
	80	79,9 ± 28,0	77,0 ± 6,0	2,79	1,07 × 10 ¹²	- 43,7
Poudre, revêtues de carbone	25	149,0 ± 89	27,2 ± 10,3	NA	NA	- 24,0
	35	167,0 ± 110	37,0 ± 11,6	NA	NA	- 29,0

Abréviations : MDD, Diamètre annoncé par le fournisseur; NA, non applicable.

^a Moyenne ± SD. ^b Potentiel Zêta dans l'eau déionisée.

Des cellules HEK ont été traitées pendant 24 heures avec une gamme de concentrations allant de 1,7 µg/mL à 0,544 ng/mL, puis leur viabilité a été évaluée par les techniques au MTT, au bleu d'Alamar ainsi qu'à l'aide d'un kit commercial basé sur une méthode colorimétrique pour la détermination du nombre de cellules viables en prolifération ; parallèlement, des médiateurs pro-inflammatoires ont été mesurés (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 et TNF-α).

Les résultats montrent que l'effet des nanoparticules d'argent non lavées induisent une diminution statistiquement significative et dose-dépendante de la viabilité des HEK après une exposition de 24 heures à 0,34 µg/mL par les techniques au bleu d'Alamar ainsi qu'à l'aide d'un kit commercial et à 1,7 µg/mL par la méthode au MTT. Cet effet est accompagné d'une augmentation significative d'IL-1β, IL-6, IL-8, et de TNF-α. En revanche, les nanoparticules d'argent lavées et les nanoparticules d'argent revêtues de carbone n'ont montré aucune diminution significative de la viabilité quelle que soit la concentration et la méthode d'évaluation utilisée. D'après les auteurs, cette étude a permis de démontrer que des nanoparticules d'argent sont non toxiques *in vitro* lorsqu'elles sont sous forme de solutions lavées ou lorsqu'elles sont enrobées de carbone.

2 Génotoxicité *in vitro*

Dans le rapport sur l'évaluation des risques des nanomatériaux « *Nanomatériaux et produits de consommation* » de mars 2010, la génotoxicité *in vitro* des nanoparticules d'argent avait été relativement peu étudiée (test des comètes, mesure de la phosphorylation de la protéine γ-H2AX et test du micronoyau). Depuis, des nouvelles études ont été publiées sur divers systèmes d'essai *in vitro* et couvrant une large plage d'événements génétiques.

2.1 Altérations primaires de l'ADN

Test des comètes

Aucune altération significative de l'ADN n'a été trouvée par Nallathamby et Xu (2010) dans le test des comètes réalisé sur des cellules de fibroblastes de souris L929 traitées à 0,23 et 0,46 nM pendant 72 heures avec des nanoparticules d'argent (11,3 ± 2,3 nm). En revanche, des inhibitions de la croissance cellulaire, de la cytokinèse et de la mitose ont été observées. D'après les auteurs,

ces résultats montrent que les nanoparticules d'argent inhibent la ségrégation des chromosomes, mais pas leur réplication.

Deux études sur des cellules bronchiques humaines de type Beas-2B montrent une induction de lésions primaires de l'ADN telle qu'évaluée par le test des comètes :

- Kim *et al.* (2011) ont effectué le test des comètes standard et modifié (avec ou sans Fpg ou EndoIII) sur des cellules Beas-2B (ce test a été couplé au test du micronoyau). Des concentrations allant de 0,01 à 10 µg/ml de nanoparticules d'argent (particules primaires de 43 nm – Présence d'un revêtement non précisé) ont été testées pendant une période de 24 h en absence ou en présence de différents types d'« éboueurs » (*scavengers*) : SOD, catalase, mannitol et sélénite de sodium. Des augmentations significatives de la fragmentation de l'ADN ont été rapportées sur l'ensemble de la gamme de concentrations testées. Cet effet s'est avéré plus important en présence de Fpg ou d'EndoIII confirmant la génération d'ERO cellulaires libres, également démontrée par la technique utilisant la sonde fluorescente H2DCF-DA.
- Nymark *et al.* (2013) ont traité des cellules Beas-2B pendant 4 h ou 24 h avec des nanoparticules d'argent (particules primaires de $42,5 \pm 14,5$ nm ; revêtement en PVP équivalent à 15 % en poids) à des doses allant de 2 à 48 µg/cm² (soit 8 à 182 µg/ml). Dans cette dernière étude, les lésions de l'ADN ont augmenté de manière dose-dépendante aux concentrations basses de 8 à 24 µg/cm² (20,4 à 91,2 pg/ml), pour atteindre un plateau aux doses les plus élevées. Selon les auteurs, cet effet n'était probablement pas dû à des ions Ag⁺ dans le milieu, mais associée à l'absorption cellulaire de nanoparticules d'argent.

Flower *et al.* (2012) ont montré que des concentrations de 50 et 100 µg/ml de nanoparticules d'argent (40 à 60 nm) induisent des lésions primaires de l'ADN au cours du test des comètes *in vitro* réalisé sur lymphocytes humains avec une probable génération de radicaux libres. Parallèlement, les auteurs ont constaté que ces mêmes nanoparticules d'argent avaient la capacité d'adsorber les ERO à leur surface, entraînant la diminution de l'effet génotoxique d'un oxydant direct tel que l'H₂O₂.

L'étude de Ghosh *et al.* (2012) a également réalisé le test des comètes *in vitro* sur lymphocytes humains à des concentrations allant de 25 à 200 µg/ml de nanoparticules d'argent (90 à 180 nm). Les résultats montrent une augmentation statistiquement significative des lésions primaires de l'ADN avec un maximum à la concentration minimale testée de 25 µg/ml. Parallèlement, une augmentation du niveau d'ERO (sonde DCF-DA) a également été observée sur l'ensemble de la gamme de doses testées.

Des nanoparticules d'argent (JRC NM300 ; < 20 nm, revêtues de polyoxylaurate/Tween 20) ont également été testées sur cellules épithéliales rénales humaines immortalisées HK-2 (Kermanizadeh, Vranic *et al.* 2013). Les cellules ont été exposées pendant 4 heures pour évaluer l'oxydation (méthode au dihydroéthidium, HE, spécifique de la production d'ions superoxydes) et la génotoxicité (test des comètes modifié par l'ajout de FPG) ou pendant 24 heures afin d'estimer la cytotoxicité et l'induction d'inflammation (IL 6, IL8, TNF-α et MCP-1).

Des augmentations faibles mais significatives ont également été notées après 4 heures de traitement concernant la production d'ERO et les dommages à l'ADN (% de queue ADN) tels que mesurés dans le test des comètes modifié. Il faut toutefois préciser que ces effets sont survenus à des concentrations sub-létales.

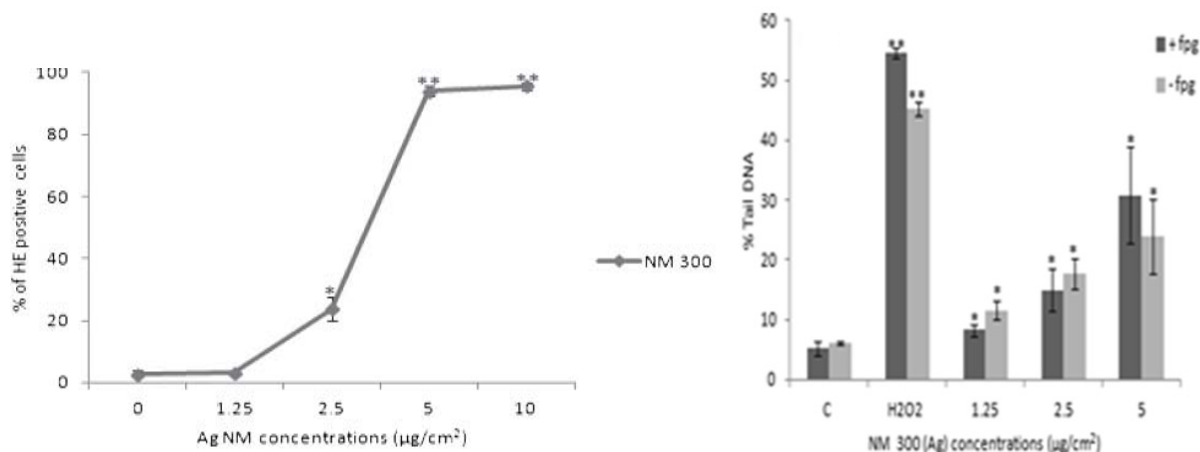


Figure 2 (Kermanizadeh, Vranic et al. 2013)

Une augmentation significative de la production d'IL-8 et d'IL-6 a également été mise en évidence mais aucun changement significatif n'a été détecté vis-à-vis du TNF- α ou de MCP-1.

Asare *et al.* (2012) ont évalué l'impact de traitements de 2 tailles de nanoparticules d'argent (20 et 200 nm) dans le test des comètes *in vitro* réalisé sur des cellules testiculaires primaires murines provenant de souris C57Bl6 sauvages (WT) et transgéniques (KO mOGG1^{-/-}) et sur une lignée cellulaire continue d'origine humaine (cellules NT2). Des traitements à des doses de 7,8 à 31 µg/cm² (10 à 100 µg/ml) ont été réalisés pendant des temps allant de 24 à 72 heures. Le maximum de fragmentation de l'ADN a été obtenu avec les nanoparticules d'argent de 200 nm sur les cellules NT2 (lignée continue d'origine humaine) alors que les résultats sur les 2 cellules testiculaires primaires murines n'ont montré que peu ou pas de fragmentation de l'ADN. Cette différence de réponse pourrait être liée au fait que les cellules testiculaires humaines sont pauvres en systèmes de réparation de lésions oxydées de l'ADN. Les auteurs ont néanmoins conclu que les nanoparticules d'argent pourraient avoir une possible implication dans la reproduction.

Adduits à l'ADN

Foldberg *et al.* (2011) ont déterminé le nombre d'adduits à l'ADN par la méthode du post marquage au ³²P sur cellules alvéolaires humaines A549 après 24 heures de traitement (avec ou sans prétraitement avec 10 mM de N-acétyl cystéine, NAC) à des concentrations allant de 0 à 20 µg/ml de nanoparticules d'argent (particules primaires 30 à 50 nm, 149 ± 34 nm dans le milieu de culture) revêtues avec 0,2 % de PVP. Les données obtenues montrent une augmentation significative et liée à la dose du niveau d'adduits encombrants après traitement aux nanoparticules d'argent. En revanche, en présence de NAC, la formation d'adduits est inhibée ce qui tend à démontrer un mécanisme d'action génotoxique *via* l'oxydation. La génération d'ERO a par ailleurs été confirmée par la technique utilisant la sonde fluorescente H₂DCF-DA.

2.2 Mutations géniques

Le test d'Ames vis-à-vis des 5 souches de *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 et TA102 a été réalisé sur une gamme de doses de nanoparticules d'argent (4 à 12 nm) allant de 0,15 à 76,9 µg/boîte (Li et al, 2011). Aucune augmentation significative du nombre de révertants n'a été observée. Il faut noter que les nanoparticules d'argent se sont révélées très toxiques vis-à-vis des bactéries à des doses supérieures à 20 µg/boîte. Ces résultats sont donc à prendre avec beaucoup de précautions étant donné que l'on considère comme peu pertinent l'absence de mutagenèse dans le test d'Ames à des doses inférieures à 250 µg/boîte (Müller *et al.*, 2006 ; Kenyon *et al.*, 2007).

Des résultats qualitativement similaires ont été notés par Kim *et al.* (2012, 2013). Selon ces auteurs, des nanoparticules d'argent de taille moyenne de 10 nm (présence d'un revêtement non précisé) n'ont induit aucune augmentation significative du nombre de révertants au cours d'un test d'Ames réalisé jusqu'à 500 µg par boîte vis-à-vis des souches de *Salmonella typhimurium*.

(TA1535, TA1537, TA98 et TA100) et de *Escherichia coli* (WP2uvrA) aussi bien en présence qu'en absence d'un système d'activation métabolique.

Il faut souligner que les tests de mutagenèse sur des systèmes d'essai bactériens ne sont pas considérés comme pertinents pour les nanoparticules, en raison d'une absorption limitée et très hypothétique.

Au cours du test de mutation génique sur cellules de mammifères (MLA/TK), les traitements de cellules L5178Y de lymphome de souris avec des nanoparticules d'argent (5 nm) ont induit une augmentation significative du nombre de mutants à des doses comprises entre 3 et 6 µg/ml. Dans le test des comètes réalisé sur les mêmes cellules, si aucune induction significative de dommage à l'ADN n'a été observée dans des conditions standards, une augmentation liée à la dose a été notée au cours de l'essai modifié dans lequel des endonucléases ont été ajoutées afin de mettre en évidence lésions oxydatives de l'ADN. Il est intéressant de noter que l'analyse de l'expression génique a montré que l'expression de 17 des 59 gènes étudiés (gènes impliqués dans la production d'ERO, dans la réponse au stress oxydatif, des gènes codant pour des antioxydants, des transporteurs d'oxygène, et des gènes de réparation de l'ADN) était modifiée dans les cellules traitées avec les nanoparticules d'argent. Ces résultats suggèrent que les nanoparticules d'argent de 5 nm sont mutagènes dans les cellules de lymphome de souris en particulier par induction de stress oxydatif (Nan Mei et al, 2012).

2.3 Mutations chromosomiques

Comme cité préalablement, Kim *et al.* (2011) ont effectué le test du micronoyau *in vitro* couplé au test des comètes sur des cellules bronchiques humaines BEAS-2B. Des concentrations allant de 0,01 à 10 µg/ml de nanoparticules d'argent (43 nm) ont été testées pendant une période de 24 heures. Parallèlement aux augmentations significatives de la fragmentation de l'ADN observées sur l'ensemble de la gamme de concentrations testées dans le test des comètes, le test du micronucleus a été conclu positif, même si l'induction de micronoyaux s'est révélée être relativement faible (<3).

Li *et al.* (2011) ont effectué le test du micronoyau *in vitro* sur des cellules lymphoblastoïdes humaines TK6. Des concentrations allant de 10 à 30 µg/ml de nanoparticules d'argent (4 à 12 nm) ont été testées pendant une période de 28 h en absence d'activation métabolique. Des augmentations significatives de la fréquence de cellules micronucléées ont été rapportées pour les 2 concentrations maximales testées de 25 et 30 µg/ml qui présentent par ailleurs des niveaux de cytotoxicité relativement importants (respectivement 60 et 45 % de RPD par rapport au témoin négatif). L'induction de micronoyaux s'étant révélée relativement faible (< 3), ces résultats ont été considérés équivoques par les auteurs.

D'après Bohmert *et al.* (2012), des nanoparticules d'argent recouvertes d'un peptide de motif Cys-Lys-Lys et de taille moyenne de 20 et 40 nm n'ont entraîné aucune induction significative de micronoyaux dans des cellules V79 de poumon de hamster chinois traités à la concentration maximale de 25 ou 50 µg/ml respectivement pour les nanoparticules de 20 et 40 nm. Les auteurs précisent que le choix de la forte dose a été conditionné par l'interférence des agglomérats formés avec la lecture au microscope. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution étant donné qu'aucun résultat n'est présenté.

Le test du micronoyau *in vitro* a également été réalisé sur des cellules humaines d'origine hépatique HepG2 (Kawata, Osawa *et al.* 2009). Ces cellules ont été traitées pendant une période de 24 h à la concentration unique de 1 µg/ml de nanoparticules d'argent (7 à 10 nm), avec ou sans cystéine comme substance antioxydant. Des augmentations significatives de la fréquence de cellules micronucléées ont été notées avec 47,9 % de cellules micronucléées à 1 µg/ml de nanoparticules d'argent (29,3 % en présence de cystéine) contre 2,1 dans le groupe témoin négatif et 2,6 pour les ions Ag testés sous forme de AgCO₃. Les auteurs ont complété ces observations en étudiant les modulations de l'expression génique des cellules HepG2 traitées pendant 24 heures avec 1 µg/ml de nanoparticules d'argent ou d'Ag ionique sur puces à ADN Affimérix (8795 gènes). Avec 236 gènes surexprimés et 293 sous-exprimés, les résultats indiquent des altérations de différents processus biologiques tels que ségrégation chromosomique, division et

prolifération cellulaire, synthèse et réparation de l'ADN, etc. Il est intéressant de noter que les voies de signalisation affectées par le traitement avec AgCO_3 sont similaires à celles modulées suite au traitement avec les nanoparticules d'argent. En revanche, à l'exception de HSPB1, les gènes inductibles par stress de 3 métallothionéines et de 3 protéines de choc thermique sont surexprimés suite à un traitement par les nanoparticules d'argent mais pas par AgCO_3 . Les auteurs concluent que les nanoparticules d'argent et les ions Ag^+ contribuent aux effets (géo)toxiques des nanoparticules d'argent.

Des concentrations de 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ de nanoparticules d'argent avec un revêtement à base d'amidon augmentent les dommages de l'ADN dans le test des comètes ainsi que la fréquence de micronoyaux (test du micronoyau) sur fibroblastes pulmonaires humains normaux (IMR-90) et sur cellules d'un glioblastome humain (U251), avec des rapports d'induction de l'ordre de 2 à 3 fois (Asharani *et al.* 2009).

Des lymphocytes humains traités pendant 24 h avec 15 $\mu\text{g/ml}$ de nanoparticules d'argent (diamètre approximatif $< 100 \text{ nm}$ - Sigma Aldrich, USA) ont montré des réarrangements chromosomiques de type tri-radial (Ernest *et al.* 2013). Ce type d'effet doit être considéré comme un véritable marqueur de clastogénèse étant donné qu'il correspond à un double événement génétique, cassure et réparation. Après 24 h d'exposition, des pourcentages de 8 et 24 % de cellules aberrantes ont été trouvés respectivement à 15 et 25 $\mu\text{g/ml}$ de nanoparticules d'argent (pour cette dernière concentration, les aberrations observées étaient des gaps et cassures).

D'après Kim *et al.* (2012), des nanoparticules d'argent de taille moyenne de 10 nm (présence de revêtement non précisé) n'ont pas augmenté la fréquence d'aberrations chromosomiques ni structurales, ni numériques (polyploïdie ou endoreduplication) sur des cellules ovariennes de hamster chinois CHO-K1 traitées pendant un temps continu de 24 h (de 0,488 à 1,953 $\mu\text{g/ml}$) ou pour un temps court de 6 h en présence d'un système d'activation métabolique (de 7,813 à 31,25 $\mu\text{g/ml}$) ou sans (de 0,977 à 3,906 $\mu\text{g/ml}$).

En revanche, un traitement de 24 h avec nanoparticules d'argent de taille approximative de 58,9 nm (aucun revêtement indiqué) a induit une augmentation dose-dépendante de la fréquence de micronoyaux (0,1 à 10 $\mu\text{g/mL}$; avec et sans S9-mix) sur cellules CHO-K1 (Kim *et al.* 2013). L'induction de micronoyau s'est révélée supérieure en absence de cytochalasine B qu'avec cytochalasine B.

3 Génotoxicité *in vivo*

Concernant l'activité génotoxique *in vivo*, dans le rapport de l'Anses publié en mars 2010, seul un test du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse chez le rat après exposition par voie orale selon la ligne directrice OCDE 471 était disponible dans la littérature (Kim, Kim *et al.* 2008). Celui-ci s'était révélé clairement négatif sur l'ensemble de la gamme de doses testées de 30 à 1 000 mg/kg/jour avec une exposition systémique démontrée. En revanche, la forme chimique sous laquelle se présente l'argent (Ag^0 nanoparticulaire ou argent ionique) n'a pas été déterminée. Depuis 2010, quelques nouvelles études décrites ci-après ont été publiées.

Récemment, l'étude de Song *et al.* (2012) a montré une augmentation significative du nombre de micronoyaux sur cellules du sang périphérique (réticulocytes) détectée 48 h après une administration intra-péritonéale unique de 3 mg/animal de nanoparticules d'argent ($< 100 \text{ nm}$ Sigma-Aldrich, surface spécifique de 5 m^2/g) chez la souris femelle (souche ICR, 7 semaines).

Une augmentation du niveau de guanines oxydées (8-OHdG) a également été observée dans les urines des souris traitées collectées pendant 24 h. En revanche, aucune augmentation de la 8-OHdG n'a été notée dans le foie à 24 h.

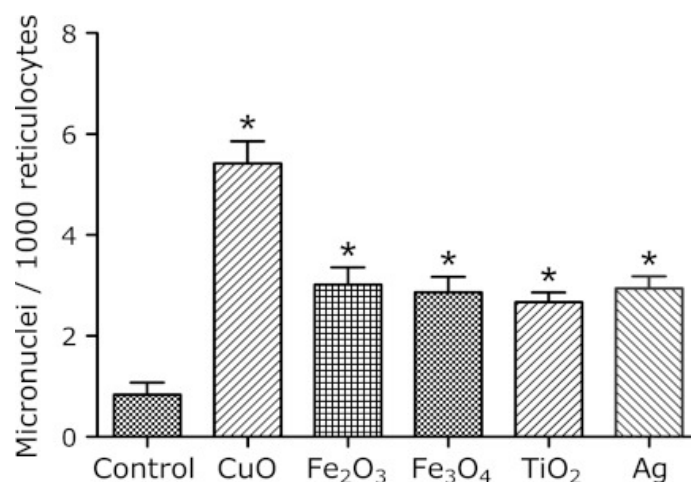


Figure 3 : Fréquences de réticulocytes micronucléés 48 h après administration par voie intrapéritonéale de 3 mg/animal de différentes nanoparticules d'oxyde métallique (d'après Song *et al.*, 2012)^a.

^a. Chaque valeur représente la moyenne de 4-6 souris ± SE.

* indique des niveaux significativement plus élevés par rapport au contrôle $p < 0,05$. Au total, 3 000 réticulocytes pour chaque souris ont été analysés.

L'étude de Ghosh *et al.* (2012) a également montré une augmentation significative du nombre d'aberrations chromosomiques (majoritairement des cassures de chromatides) sur cellules de moelle osseuse de souris Swiss mâles traitées par voie intra péritonéale à des doses uniques allant de 10 à 80 mg/kg de nanoparticules d'argent (90 à 180 nm). Le test des comètes réalisé en parallèle sur les mêmes cellules a mis en évidence une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN avec un maximum à la dose de 20 mg/kg. Une augmentation du niveau d'ERO (sonde DCFH-DA) a également été observée au niveau des cellules de moelle osseuse aux doses de 10 et 20 mg/kg.

Cet effet génotoxique n'a pas été retrouvé dans le test des comètes réalisé sur les cellules de la moelle osseuse de rat mâle Sprague Dawley après 12 semaines de traitement en chambre d'inhalation (corps entier, 6 h/j) à des doses allant de 49 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ à 381 de nanoparticules d'argent (14 à 15 nm de diamètre) et un recueil 24 h après la dernière exposition (Cho, Sung *et al.* 2013). Si la distribution des nanoparticules n'a pas été étudiée spécifiquement dans la moelle osseuse, les nanoparticules sont retrouvées dans divers organes, y compris le sang et le foie, ce qui démontre l'exposition médullaire.

Le test du micronucleus *in vivo* sur moelle osseuse (ligne directrice OCDE 474) a également été couplé à l'essai de toxicité sub-chronique (OCDE 413) réalisé chez des rats Sprague-Dawley mâles et femelles exposés à des nanoparticules d'argent pendant 90 jours par inhalation (chambre d'exposition corps entier). Les essais ont été réalisés sous référentiel des Bonnes pratiques de laboratoire (Kim, Sung *et al.* 2011).

Les auteurs précisent que les nanoparticules d'argent utilisées dans le cadre de cette étude ont été générées de la même façon que dans les publications de Ji *et al.* (2007) et Sung *et al.* (2008), citées dans le précédent rapport de l'Anses de mars 2010. Un générateur de nanoparticules d'argent par évaporation / condensation a donc été utilisé avec une chambre d'exposition consistant en un élément chauffant en céramique capable de distribuer les concentrations désirées de nanoparticules d'argent à l'intérieur des chambres d'inhalation. Les rats ont été exposés à des nanoparticules d'argent (diamètre 18 nm) à des concentrations de $0,7 \times 10^6$ particules/ cm^3 (faible dose), $1,4 \times 10^6$ particules/ cm^3 (dose moyenne) et de $2,9 \times 10^6$ particules/ cm^3 (dose forte), 6 heures / jour en chambre d'inhalation pendant 90 jours. Les rats ont été sacrifiés, les fémurs ont été prélevés et la moelle osseuse recueillie 24 h après la dernière exposition. Pour l'évaluation de la toxicité, le rapport PCE/NCE (érythrocytes polychromatiques/érythrocytes normochromomatiques) a été calculé sur la base d'un total de 200 érythrocytes. Concernant la génotoxicité, la fréquence d'érythrocytes polychromatiques micronucléés (MNPCEs) a été estimée après analyse de 2 000 érythrocytes polychromatiques par animal.

Les résultats ont montré qu'après exposition pulmonaire de 90 jours aux nanoparticules d'argent, il n'y a pas de différences statistiquement significatives dans les fréquences de MNPCE (permettant d'estimer la génotoxicité) par rapport au groupe non traité quelle que soit la dose testée. Les auteurs ont conclu que l'exposition à des nanoparticules d'argent par inhalation pendant 90 jours n'a pas induit de génotoxicité *in vivo* au niveau de moelle osseuse de rats mâles et femelles.

Ce test du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse a été correctement mené, suivant les recommandations de la ligne directrice OCDE 474 et sous référentiel des BPL. Il faut néanmoins préciser qu'aucune diminution du rapport PCE/NCE (permettant d'estimer la toxicité donc l'exposition systémique), n'a été observée. Ceci interroge donc sur la réelle exposition de la moelle osseuse, organe cible dans ce système d'essai. Les auteurs précisent d'ailleurs que les poumons et le foie sont les principaux organes cibles suite à une exposition prolongée avec des nanoparticules d'argent alors que l'exposition de la moelle osseuse reste très hypothétique.

Enfin, il est intéressant de rappeler que dans la publication de Kim *et al.* (2008) citée dans le rapport de mars 2010, aucune augmentation significative du nombre de MNPCE n'avait été notée quelle que soit la dose étudiée au cours du test du micronucleus sur moelle osseuse effectué chez le rat traité par voie orale (gavage) pendant 28 jours (jusqu'à la dose maximale de 1 000 mg/kg/jour) avec des nanoparticules d'argent (diamètre moyen de 60 nm).

Grodmazka- Ostrowska *et al.* (2012) ont comparé la génotoxicité *in vivo* de particules d'Ag (200 ± 50 nm) et de nanoparticules d'argent (nanoparticules sphériques de diamètre nominal de 20 ± 5 nm - PlasmaChem, Allemagne) sur cellules germinales de rats Wistar mâles. Des doses uniques de 5 et 10 mg/kg (nanoparticules de 20 ± 5 nm) ou de 5 mg/kg (200 ± 50 nm) ont été administrées par voie intraveineuse, puis le test des comètes a été réalisé au niveau testiculaire à 24 h, à 7 et 28 jours après le traitement. Les résultats de cette étude montrent que les dommages primaires de l'ADN (% d'ADN dans la queue) dans les cellules germinales ont été significativement augmentés exclusivement au temps de recueil 24 h après le traitement pour les 2 groupes traités avec 5 et 10 mg/kg de nanoparticules d'argent. En revanche, aucune différence significative de la fragmentation de l'ADN n'a été trouvée entre les groupes traités aux nanoparticules d'argent et les animaux du groupe contrôle 7 et 28 jours après l'injection. Concernant les particules d'Ag (200 ± 50 nm), aucune différence significative dans le niveau d'altération primaire de l'ADN n'a été retrouvée entre les animaux du groupe contrôle et les animaux du groupe avec ces particules, quel que soit le temps de prélèvement.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Liu *et al.* (2010), qui ont montré que, d'une part, les nanoparticules de plus petite taille pénètrent dans les cellules plus facilement que les nanoparticules de plus grande taille. D'autre part, la petite taille des nanoparticules facilite la libération d'ions Ag^+ depuis la zone de surface, car une plus grande surface est exposée à l'environnement.

Une évaluation de l'activité génotoxique des nanoparticules d'argent a également été réalisée chez la drosophile en recherchant l'induction de mutations et de recombinaisons somatiques (SMART) au niveau des ailes de *Drosophila melanogaster* (Demir *et al.* 2011). Les nanoparticules d'argent (< 60 nm) ont été fournies au 3^{ème} stade larvaire à des concentrations allant de 0,1 à 10 mM. Les résultats ont montré que des augmentations faibles mais significatives de la fréquence de mutations ponctuelles ont été observées principalement par l'induction de recombinaison somatique. Ces résultats positifs obtenus avec des nanoparticules d'argent contrastent avec les résultats négatifs obtenus avec la forme ionique de l'argent testée (AgNO_3).

4 Modes d'action génotoxiques

Différents mécanismes peuvent être responsables de l'effet génotoxique *in vitro* de nanoparticules d'argent, tels que la libération d'ions Ag^+ à partir des particules dans le milieu de culture, l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), due à la pénétration des particules à travers la membrane cellulaire, et la charge de surface positive des nanoparticules d'argent permettant l'interaction avec l'ADN chargé négativement (El Badawy *et al.* 2011, Johnston *et al.* 2010, Nymark *et al.* 2013, Kim, Kim, *et al.* 2011).

4.1 Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)

En effet, parmi les mécanismes d'action génotoxiques directs des nanoparticules d'argent, la production d'ERO a été particulièrement étudiée. D'après de nombreux auteurs, la toxicité des nanoparticules d'argent semble en premier lieu être provoquée par l'augmentation des niveaux d'ERO (Völker, Oetken *et al.* 2013). D'après Bartłomiejczyk *et al.* (2013), la production accrue d'ERO affecte la chaîne respiratoire mitochondriale et augmente la quantité de protéines non-repliées ou mal repliées dans le réticulum endoplasmique (RE), induisant un stress du RE et une réponse de la protéine mal repliée. Ces deux types de dommages cellulaires conduisent à une nouvelle génération d'ERO, à des lésions de l'ADN et à l'activation de diverses voies de signalisation menant à de l'inflammation et à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose.

Plusieurs études *in vitro* réalisées avec des nanoparticules d'argent ont confirmé la corrélation entre augmentation des niveaux d'ERO et apoptose (Foldbjerg, Dang *et al.* 2011; Sanpui, Chattopadhyay *et al.* 2011). Ainsi, l'un des mécanismes d'action toxique des nanoparticules d'argent peut être une mort cellulaire programmée avec un effet dose-dépendant impliquant plusieurs voies apoptotiques potentiellement induites par les ERO (Völker, Oetken *et al.* 2013).

L'analyse de l'expression génique de cellules de lymphome de souris traitées avec des nanoparticules d'argent de 5 nm suggère que celles-ci sont mutagènes dans les cellules de lymphome de souris en particulier par induction de stress oxydatif (Mei *et al.* 2012).

D'après Chen *et al.* (Chen *and* Schluesener 2008) les nanoparticules d'argent peuvent effectivement induire des effets délétères en générant des ERO et en interagissant avec les groupes thiol des protéines. Il semble que les ions Ag^+ forment préférentiellement des complexes avec les groupes sulfhydryle dans de nombreux types cellulaires, en particulier avec le GSH. En revanche, aucun changement des niveaux de GSH (glutathion réduit) n'a été noté *in vitro* dans les cellules C3A traitées pendant 2, 6 et 24 heures à des concentrations de 1, 2 ou 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanoparticules d'argent (JRC NM-300) ou *in vivo* dans les hépatocytes de rats exposés par voie intraveineuse à 50 $\mu\text{g}/\text{animal}$ avec ces mêmes nanoparticules d'argent (Gaiser *et al.* 2012).

L'implication des ERO a également été démontrée *in vivo*. Dans une étude récente (Ebabe *et al.* 2013), des rats mâles Sprague Dawley ont été traités pendant 81 jours par voie orale à la dose unique de 500 mg/kg de nanoparticules d'argent (14 à 15 nm de diamètre). Les mesures de la production d'anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) réalisées au niveau du foie et du cœur ont permis de mettre en évidence une augmentation de 30 et de 41 % d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ respectivement au niveau hépatique et cardiaque. Les auteurs relient cette augmentation à la faible diminution de la paraoxonase plasmatique, une estérase hydrolysant les lipides oxydés. En revanche, les niveaux de malondialdéhyde (MDA) et de superoxyde dismutase (SOD) au niveau du foie n'ont montré aucune différence significative entre les groupes d'animaux témoins et traités. Parallèlement, la détermination des taux de 2 cytokines, *i.e.* TNF- et IL-6 impliquées dans l'initiation de l'inflammation et mesurées au niveau hépatique ont augmenté respectivement de 12 et de 9 % d' $\text{O}_2^{\cdot-}$. Les auteurs indiquent que lorsque le niveau d'ERO est trop important et dépasse la capacité des systèmes antioxydants, les cellules sont alors exposées à un « stress oxydant » qui maintient un état inflammatoire et ils concluent que le « stress oxydant » induit par les nanoparticules d'argent est un facteur important pour leur nocivité.

4.2 Implication des ions Ag^+ dans l'activité génotoxique des nanoparticules d'argent

La libération d'ions Ag^+ pourrait également contribuer à l'activité génotoxique *in vitro* de nanoparticules d'argent. La part de toxicité du fait de la présence d' Ag^+ reste difficile à évaluer.

Les nanoparticules d'argent (NM 300) ont une très faible solubilité dans les milieux aqueux. Celle-ci est dépendante de la dose (7×10^{-6} et $6,3 \times 10^{-4}$ mg/ml à 1 et 128 mg/ml, respectivement) et de la taille des nanoparticules (Kermanizadeh, Pojana *et al.* 2013). En effet, comme cela avait été préalablement publié, les nanoparticules de plus petite taille libèrent des quantités plus importantes d'ions Ag et la cytotoxicité des ions Ag libérés est différente du témoin sans particules uniquement pour des solutions avec des particules de petite taille (5,7 et 7,8 nm) (Pratsinis *et al.* 2013).

La libération d'ions Ag est également dépendante du milieu. Par exemple, la solubilité des nanoparticules d'argent (NM 300) est légèrement plus faible dans le milieu de culture pour cellules C3A (1×10^{-6} et $3,9 \times 10^{-4}$ mg/ml à 1 et 128 mg/ml, respectivement) avec moins de 1 % qui se dissout dans ce milieu après 24 h d'incubation. Il est donc très peu probable que la toxicité observée dans les cellules humaines d'origine hépatique C3A soit due à la libération d'ions (Kermanizadeh, Gaiser *et al.* 2012). À l'inverse, la solubilité des nanoparticules d'argent a par ailleurs été reliée à la libération d'ions argent qui contribuent à leur toxicité (Fabrega *et al.* 2011a ; Kim, Kim, *et al.* 2011.).

Par ailleurs, les nanoparticules d'argent testées sont fréquemment revêtues ou fonctionnalisées pour améliorer leur mise en suspension et empêcher leur agglomération dans des suspensions aqueuses. Cependant, de tels revêtements altèrent les propriétés de surface de ces nanoparticules d'argent et influencent la libération d'Ag⁺ ce qui peut alors biaiser l'interprétation des données de toxicité (Pratsinis *et al.* 2013).

Il n'est donc pas complètement élucidé si les ions Ag⁺ dissous et/ou la forme particulaire interagissent avec les composés cellulaires et certains auteurs concluent que les effets toxiques observés avec les nanoparticules d'argent sont provoqués à la fois par les ions Ag⁺ et par la forme particulaire.

Eom et Choi (2010) et Foldbjerg *et al.* (2011) ont démontré que les nanoparticules d'argent induisent des niveaux d'ERO supérieurs à ceux induits par les ions Ag⁺. De plus, des augmentations d'expression des facteurs de transcription comme Nrf-2 et NF-κB, ainsi que l'accumulation de dommages de l'ADN provoquant l'apoptose ont été observés avec nanoparticules d'argent alors que ces effets ne sont pas marquant avec les ions Ag (Eom and Choi 2010).

La libération d'ions Ag⁺ libres peut contribuer en partie, mais pas entièrement, aux effets toxiques observés avec les nanoparticules d'argent (Gaiser *et al.* 2011 ; Laban *et al.* 2010). Des études récentes confirment que la toxicité des nanoparticules d'argent est partiellement due à la libération d'ions argent (Gorth *et al.* 2011; Loeschner *et al.* 2011). La publication de Barto *et al.* (2013) démontre une différence considérable entre les profils d'expression géniques de cellules épithéliales de poumon humain A549 traitées avec des nanoparticules d'argent (plus de 1 000 gènes modulés plus de 2 fois) ou avec des ions Ag⁺ (133 gènes modulés plus de 2 fois) bien que ces derniers induisent également un « stress oxydant ».

La dose intracellulaire d'ions Ag⁺ est plus élevée quand les cellules ont été exposées aux nanoparticules d'argent comparativement aux formes ioniques testées sous forme de sels d'AgNO₃ (Cronholm *et al.* 2013). Des processus à la fois chimiques et électrochimiques gouvernent le mécanisme de libération des ions Ag⁺ à partir des nanoparticules d'argent. La libération de l'Ag des nanoparticules d'argent génère des intermédiaires peroxydes comme H₂O₂ très réactif et qui va rapidement interagir avec les biomolécules ou l'Ag métallique. Ainsi, des oxydes ou hydroxydes d'Ag apparaissent à la surface des agglomérats de nanoparticules d'argent.

L'absorption des nanoparticules d'argent est plus importante comparée à l'absence ou la faible absorption des sels solubles d'Ag. De plus, les ions métalliques provenant des sels d'Ag vont également former des complexes et des colloïdes avec les éléments du milieu cellulaire comme le montre les résultats de DLS avec l'AgNO₃ (Cronholm *et al.* 2013). Ces processus compliquent la comparaison directe entre les résultants d'absorption de l'Ag sous forme particulaire et ionique.

Dans les 2 lignées cellulaires étudiées par Cronholm *et al.* (2013), les ions Ag⁺ dissous à partir d'AgNO₃ induisent bien plus d'altération de l'intégrité membranaire que les nanoparticules d'argent qui ne provoquent aucun effet et ce malgré l'absorption plus élevée d'Ag. Ainsi, les espèces ioniques induisent plutôt une toxicité agissant sur la membrane cellulaire, indépendamment de l'absorption. Les nanoparticules d'argent n'agissent pas par un effet cheval de Troie. La bonne absorption mais le manque de toxicité observée avec les nanoparticules d'argent est probablement dû à la faible libération intracellulaire d'ions Ag⁺ (Cronholm *et al.* 2013).