

RAPPORT D'ÉTUDE
DRC-17-163635-11558A

25/01/2018

**Synthèse des analyses relatives à la toxicologie
des nanoparticules d'argent lors d'expositions
environnementales par voie respiratoire ou orale**

**Synthèse des différentes analyses relatives
à la toxicologie des nanoparticules d'argent lors
d'expositions environnementales par voie respiratoire
ou orale**

Direction des risques chroniques (DRC)
Pôle Dangers et impact sur le vivant (VIVA)
Unité Expertise en Toxicologie/Écotoxicologie
des Substances chimiques (ETES)

Client : Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire

Liste des personnes ayant participé à l'étude : Michèle BISSON, Maryse MARLIERE

PRÉAMBULE

Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

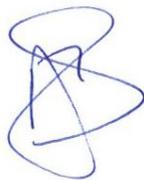
	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Michèle BISSON	Sandrine ANDRES	Eric THYBAUD
Qualité	Ingénieur à l'Unité d'Expertise en Toxicologie/Ecotoxicologie des Substances chimiques	Responsable de l'Unité d'Expertise en Toxicologie/Ecotoxicologie des Substances chimiques	Responsable du Pôle Dangers et Impact sur le Vivant
Visa			

TABLE DES MATIÈRES

RESUME	6
GLOSSAIRE	7
1. INTRODUCTION	8
2. PROPRIETES	8
3. TOXICOCINETIQUE	8
3.1 Absorption	9
3.2 Distribution	9
3.3 Métabolisme.....	10
3.4 Élimination.....	10
4. EFFETS AIGUS	10
4.1 Voie respiratoire	10
4.2 Voie orale	10
4.3 Voie cutanée	11
4.4 Voie oculaire	11
5. EFFETS POUR DES EXPOSITIONS REPETEES (SUB-AIGUËS, SUB-CHRONIQUES ET CHRONIQUES)	11
5.1 Effets systémiques généraux	11
5.1.1 Voie respiratoire.....	11
5.1.1.1 Expositions par inhalation.....	11
5.1.1.1.1 Exposition sub-aiguë.....	11
5.1.1.1.2 Exposition sub-chronique	12
5.1.1.2 Exposition par instillation Intra-trachéale.....	12
5.1.2 Voie orale	13
5.1.2.1 Exposition sub-aiguë	13
5.1.2.2 Expositions sub-chronique	14
5.2 Effets génotoxiques et cancérogènes	14
5.2.1 Effets génotoxiques	14
5.2.2 Effets cancérogènes.....	15
5.3 Effets sur le développement ou la reproduction	15
6. CONCLUSION	15
7. BIBLIOGRAPHIE	16

RESUME

L'argent sous forme nanométrique (noté nanoAg) est de plus en plus utilisé. Dans le même temps, dans un but de prévention et à des fins exploratoires, de nombreux travaux sont menés afin d'évaluer les propriétés de danger propres au nanoAg. Le présent rapport propose une synthèse des principaux résultats rapportés par les différentes monographies publiées au cours des dernières années (ANSES, 2015 ; EFSA, 2016 ; OCDE, 2016 ; SCENIHR, 2014).

L'Ag est chimiquement relativement instable et peut donc se présenter sous différents degrés d'oxydation. Les nanomatériaux d'Ag existent sous différentes formes le plus souvent sous forme de nanoparticules mais aussi de nanofils. Le nanoAg est par ailleurs souvent recouvert d'un revêtement de surface tel que du citrate, de l'amidon ou du polyvinylpyrrolodine (PVP) qui permet de le stabiliser.

Les nanoAg sont adsorbés par voie orale et respiratoire. Chez l'animal, les nanoAg se distribuent préférentiellement dans le foie, la rate, les reins et les poumons et passent différentes barrières tissulaires (barrières hémato-encéphalique, placentaire ou hémato-testiculaire).

Les effets observés après des expositions répétées (aiguës et sub-chroniques) sont limités et concernent essentiellement les organes primo-exposés (poumons, intestin) ou des organes systémiques (foie, rate et reins). Il n'existe pas d'étude pour des expositions chroniques.

GLOSSAIRE

Ag	Argent
ALT	Alanine aminotransférase
ANSES	Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AST	Aspartate aminotransférase
BET	Surface spécifique de Brunauer-Emmett-Teller
ECHA	European Chemicals Agency
EFSA	European Food Safety Authority
JEFCA	Joint Expert Group on Food Additives
LBA	Liquide broncho-alvéolaire
LDH	Lactate déshydrogénase
LOAEC	Lowest observable adverse effect concentration
LOAEL	Lowest observable adverse effect level
MMAD	Diamètre aérodynamique moyen
nanoAg	Particules d'argent nanométriques
NOAEC	No observable adverse effect concentration
NOAEL	No observable adverse effect level
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Économiques
PVP	Polyvinylpyrrolodine
SCENIHR	Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks

1. INTRODUCTION

Les nanoparticules d'argent (noté nanoAg) sont de plus en plus utilisées dans diverses applications du fait de leurs propriétés spécifiques notamment antibactériennes et antifongiques. Cette utilisation croissante est à l'origine d'une exposition permanente des populations aussi bien professionnelle que via l'environnement. Dans le même temps, dans un but de prévention et à des fins exploratoires, de nombreux travaux sont menés afin d'évaluer les propriétés de danger propres aux nanoAg. Le présent rapport propose une synthèse des principaux résultats rapportés par les différentes monographies publiées au cours des dernières années (ANSES, 2015 ; EFSA, 2016 ; OCDE, 2016 ; SCENIHR, 2014). La recherche bibliographique a été réalisée au premier semestre 2016 et s'est limitée à rechercher les monographies publiées au cours des dernières années. L'analyse de leur contenu a permis d'en sélectionner 4 d'entre elles comme étant les plus adaptées à l'évaluation des dangers pour l'homme (ANSES, 2015 ; EFSA, 2016 ; OCDE, 2016 ; SCENIHR, 2014). Il s'agit ici de présenter une synthèse des principales conclusions de ces documents afin d'évaluer si les données pourraient être suffisantes pour une analyse plus approfondie en vue de l'élaboration de valeurs repères préliminaires. En aucun cas, il ne s'agit d'une description exhaustive de l'ensemble des données bibliographiques relatives aux nanoAg.

2. PROPRIETES

L'Ag (CAS n° 7440-22-4) existe sous de nombreuses formes dans différentes espèces chimiques. L'Ag est chimiquement relativement instable et peut donc se présenter sous différents degrés d'oxydation : Ag métallique pur (Ag^0) ou ion Ag (le plus souvent Ag^+ , mais aussi Ag^{2+} ou Ag^{3+}). Les nanomatériaux d'Ag sont le plus souvent sous formes de nanoparticules mais aussi de nanofils d'Ag. Le nanoAg est souvent recouvert d'un revêtement de surface tel que du citrate, de l'amidon ou du polyvinylpyrrolodine (PVP) qui permet de le stabiliser.

Ainsi la nature de la composition chimique de surface, ou l'enrobage, des nanoparticules peut varier d'une nanoparticule à l'autre en fonction de la préparation modifiant les capacités de réaction de la nanoparticule.

Comme l'ensemble des nanoparticules, les nanoAg se trouvent rarement sous forme individuelle : elles ont tendance à former des agglomérats et des agrégats dont la taille est comprise entre environ 0,1 et plusieurs dizaines de microns. L'état d'agglomération/agrégation varie notamment en fonction du procédé de fabrication et du milieu où se trouvent les particules (air, liquide biologique...).

La dissolution des nanoAg est étroitement dépendante du pH et de la taille des particules, il a été montré que le niveau de dissolution augmente lorsque le pH diminue et est plus élevé pour les nanoparticules que pour les particules de taille micrométrique (EFSA, 2016).

3. TOXICOCINETIQUE

Les données disponibles sont essentiellement issues des études expérimentales menées chez l'animal.

3.1 ABSORPTION

Voie orale

La biodisponibilité des nanoAg après une administration de nanoAg (7,9 nm) a été évaluée au cours d'une étude chez le rat (Park *et al.*, 2010). Le taux d'absorption calculé pour cette particule est de l'ordre de 1 à 4 % de la dose administrée (SCENIHR, 2014).

Néanmoins, l'absorption intestinale de l'argent à partir des nanoAg ingérées est dépendante de la taille de particule initiale, la forme et la présence d'un revêtement de surface. Ces propriétés influencent l'agrégation, la solubilité et la composition chimique au cours du transit intestinal (EFSA, 2016). Une étude *in vitro* semble montrer que le transport transépithélial survient avec une efficacité similaire pour les nanoAg et les ions Ag suggérant que les ions Ag sont absorbés (EFSA, 2016).

Voie respiratoire

Lors d'exposition par inhalation, l'absorption d'Ag a été démontrée par la présence d'Ag dans les poumons et dans différents tissus. Cependant, il n'est pas exclu qu'une partie soit issue d'une absorption gastrointestinale ce phénomène étant dépendant de la taille des particules (SCENIHR, 2014).

Voie cutanée

L'absorption cutanée d'Ag est effective lors de l'utilisation d'Ag dans des pansements sur des peaux brûlées alors qu'elle n'est pas quantifiée sur de la peau saine (SCENIHR, 2014).

3.2 DISTRIBUTION

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 (ANSES, 2015). La présence d'Ag dans le cerveau est observée après exposition par inhalation. Les concentrations mesurées dans les organes sont dépendantes de la taille des nanoAg, les concentrations les plus élevées étant retrouvées pour les nanoAg avec les diamètres les plus petits (EFSA, 2016). L'élimination à partir du cerveau et des testicules serait plus lente qu'à partir des autres organes. Une accumulation dans le cerveau est même décrite par certains auteurs (ANSES, 2015). Cependant cette accumulation reste faible (<1 % de la dose administrée) ; il s'agirait d'Ag sous forme ionique.

Les études menées *in vitro* semblent montrer que l'internalisation des nanoAg passe par un mécanisme d'endocytose spécifique (clathrine) pour les nanoAg isolées. Les nanoAg sous forme d'agglomérats ou d'agrégats utiliseraient une autre voie d'endocytose par l'actine (ANSES, 2015). Les mécanismes sont dépendants de la taille des nanoAg et du type cellulaire.

Certaines publications relatives à des expérimentations *in vivo* soulignent le passage d'argent de forme indéterminée (ionique ou nanoparticulaire) **à travers les barrières hémato-encéphalique, placentaire ou encore hémato-testiculaire** (ANSES, 2015).

3.3 METABOLISME

Il n'existe pas d'informations disponibles concernant le métabolisme de ces particules.

3.4 ÉLIMINATION

Après administration intraveineuse ou sous cutanée, les nanoAg sont majoritairement excrétés par voie biliaire dans les fèces (SCENIHR, 2014).

4. EFFETS AIGUS

Des expositions **aiguës ou sub-chroniques** 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 effets sont rapportés au niveau des organes primo-exposés (poumons, intestin) ou des organes systémiques (foie, rate et reins essentiellement) (ANSES, 2015).**

4.1 VOIE RESPIRATOIRE

La synthèse de l'ANSES (2015) précise que si certains auteurs n'observent pas d'effet 1 à 7 jours après l'exposition par inhalation chez la souris ou le rat, d'autres décrivent une augmentation d'un ou plusieurs biomarqueurs du liquide broncho-alvéolaire (LBA) (activité lactate déshydrogénase (LDH), nombre total de cellules, nombre de neutrophiles, contenu en protéines et en cytokines) sans association avec des effets histologiques au niveau pulmonaire.

Des zones inflammatoires au niveau pulmonaires sont observées lors d'administrations intra-trachéales de nanoparticules d'Ag, ces effets étant plus marqués avec des nanoparticules de petite taille (inférieure à 20 nm).

Des effets persistants (augmentation du contenu en collagène total des poumons, fibrose précoce et augmentation de facteurs de croissance dans le LBA) ont été notés avec des nanoparticules d'argent de 110 nm, mais uniquement à la plus forte dose (1 mg/kg). L'ensemble des études confirme l'accumulation d'Ag dans les poumons.

Une étude a montré que les nanofils d'Ag les plus long génèrent une augmentation plus marquée de granulomes d'infiltrats de lymphocytes que les plus courts.

Ces différents éléments témoignent d'une réaction inflammatoire pulmonaire modérée.

4.2 VOIE ORALE

Les rares études disponibles ne rapportent pas d'effet pour des expositions aiguës par gavage.

La DL₅₀ de nanoAg enrobées de citrate est supérieure à 2 000 mg/kg (rat mâle et femelle) (OCDE, 2016). Au cours de cette étude menée selon la ligne directrice OCDE 423, il n'a pas non plus été observé d'effet clinique aux doses de 300 et 2 000 mg/kg pc.

L'administration d'une dose de 5 000 mg/kg pc de nanoAg sphériques (diamètre de 10–20 nm) chez la souris selon la ligne directrice OCDE n°425 n'induit ni mortalité ni signes cliniques de toxicité aiguë (Maneewattanapinyo *et al.*, 2011, cité dans EFSA, 2016). La DL50 chez la souris serait donc > à 5 000 mg/kg pc de nanoAg sphériques.

4.3 VOIE CUTANEE

La DL₅₀ de nanoAg enrobées de citrate est supérieure à 2 000 mg/kg (OCDE, 2016). Les nanoAg enrobées de citrate n'induisent pas d'irritation cutanée et sont faiblement sensibilisantes, présence de résultats faiblement positifs dans un test de sensibilisation *in vivo* chez le cobaye mené selon la ligne directrice 406 (OCDE, 2016).

4.4 VOIE OCULAIRE

Les nanoAg enrobées de citrate n'induisent pas d'irritation oculaire (OCDE, 2016).

5. EFFETS POUR DES EXPOSITIONS REPETEES (SUB-AIGUËS, SUB-CHRONIQUES ET CHRONIQUES)

5.1 EFFETS SYSTEMIQUES GENERAUX

Les effets de l'exposition répétée aux nanoAg semblent limités au regard des données actuellement disponibles. Les principaux éléments sont synthétisés ci-dessous et les principales études *in vivo* pour des expositions par voie respiratoire et orale sont ensuite rapidement décrites.

L'EFSA (2016) considère qu'il pourrait y avoir un effet sur le système immunitaire. Le SCENIHR (2014) conclut que si des effets hépatiques comprenant des augmentations de différentes enzymes hépatiques sont observés, l'absence de lésions histologiques associées ne permet pas de les retenir comme effet néfaste.

De son côté l'ANSES (2015) retient que les résultats de neurotoxicité chez le rongeur sont clairsemés et montrent *in vivo* des **effets moteurs et des effets sur la mémoire qui restent cependant contradictoires**. En l'état actuel des connaissances, compte tenu du passage potentiel des nanoparticules d'argent au travers des barrières hématoencéphalique et sang/liquide cérébrospinal et de leur bioaccumulation, des effets toxiques au niveau du système nerveux central ne peuvent être exclus (ANSES, 2015).

5.1.1 VOIE RESPIRATOIRE

5.1.1.1 EXPOSITIONS PAR INHALATION

5.1.1.1.1 EXPOSITION SUB-AIGUË

Une étude expérimentale par doses répétées par inhalation a été menée selon la ligne directrice OCDE 412. Des rats Sprague Dawley ont été exposés à des nanoAg (diamètre 12 à 15 nm) à plusieurs concentrations (dose faible de $1,2 \cdot 10^4$ particules /cm³ soit 0,45 µg/m³– dose moyenne de $1,2 \cdot 10^5$ particules /cm³ soit 3,42 µg/m³– dose forte de $1,2 \cdot 10^6$ particules /cm³ soit 61 µg/m³) 6h/j, 5j/sem pendant 28 jours. Il

n'a pas été observé d'effet clinique, de mortalité, de modification du poids corporel ou de la consommation d'eau ou de nourriture ni de relation dose-effet pour les effets hématologiques chez le rat mâle. Une augmentation statistiquement significative des pourcentages de neutrophiles et d'éosinophiles chez les rats femelles est observée à la plus faible dose. Des effets hépatiques limités à des altérations histopathologiques (vacuolisation cytoplasmique, nécrose localisée) sont observés chez les mâles et les femelles à la plus forte dose. Une augmentation des concentrations en Ag est observée dans les poumons et le cerveau particulièrement au niveau du bulbe olfactif mais pas dans le sang à toutes les doses. Le « Lowest adverse effect level » (LOAEL) est la plus faible dose soit $1,2 \cdot 10^4$ particules/cm³ ou $1,2 \cdot 10^6$ nm²/cm² (Ji *et al.*, 2007 citée dans OCDE, 2016).

Chez la souris, une exposition de 28 jours à 3,3 mg/m³ 4 h / j, 5 j / semaine (diamètre des nanoAg 10 nm) 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 (Stebounova *et al.*, 2011 cité dans ANSES, 2015). L'étude montre la présence d'Ag dans les poumons et le LBA, avec une internalisation dans les phagosomes des macrophages, mais les niveaux d'Ag dans le cœur, le foie et les reins restent inférieurs à la limite de détection.

5.1.1.1.2 EXPOSITION SUB-CHRONIQUE

Une étude expérimentale par doses répétées par inhalation a été menée selon la ligne directrice OCDE 413. Des rats Sprague Dawley ont été exposés à des nanoAg (diamètre moyen 18-19 nm) à plusieurs concentrations (concentration faible de $0,6 \cdot 10^6$ particules/cm³ ou 49 µg/m³ - concentration moyenne de $1,4 \cdot 10^6$ particules/cm³ ou 133 µg/m³ - concentration élevée de $3 \cdot 10^6$ particules/cm³ ou 515 µg/m³) 6h/j, 5j/sem pendant 90 jours. Il n'a pas été observé d'effet clinique ni de mortalité. Une diminution du poids des femelles a été observée à la dose intermédiaire après 3 semaines d'exposition. Il n'y a pas de diminution de la consommation d'eau ou de nourriture. Une augmentation dose dépendante de l'albumine, de la LDH et des protéines totales est observée dans le LBA chez les femelles. Des inflammations alvéolaires sont observées dans les poumons avec l'accumulation de macrophages. Une hypertrophie des canaux biliaires est observée à la plus forte dose chez les mâles et les femelles sans qu'aucun effet sur les reins ni sur le cœur ne soit signalé. Un NOAEL de $1 \cdot 10^6$ particules/cm³ ou 100 µg/m³ est proposé par les auteurs correspondant à la concentration moyenne arrondie (Sung *et al.*, 2009, cité dans OCDE, 2016 et ANSES, 2015).

L'ANSES complète cette analyse avec d'autres données issues de la même étude et rapporte que 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 *et al.*, 2013). Une accumulation dose dépendante de la fraction d'Ag absorbée 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 *et al.*, 2013).

5.1.1.2 EXPOSITION PAR INSTILLATION INTRA-TRACHEALE

L'instillation intra-trachéale de nanoAg (52 nm en moyenne) à raison de 3,5 et 17,5 mg/kg, tous les 2 jours pendant 5 semaines provoque dans le LBA des rats exposés du stress oxydant de façon dose dépendante et de l'inflammation (Liu *et al.*, 2013 cité dans ANSES, 2015).

5.1.2 VOIE ORALE

5.1.2.1 EXPOSITION SUB-AIGUË

Dans une étude par voie orale à doses répétées menée selon la ligne directrice OCDE 407, des nanoAg enrobées de citrate ont été administrées via l'eau de boisson à des rats Sprague-Dawley aux doses de 0 – 25 – 100 – 400 mg/kg pc/j pendant 28 jours. Aucun effet néfaste ou mortalité n'a été observé au cours de cette étude (OCDE, 2016).

L'administration orale par gavage de nanoparticules d'argent (nanoparticules enrobées de PVP, diamètre 14 nm) aux doses de 2,25, 4,5 et 9 mg/kg pc/j pendant 28 jours chez le rat induit l'augmentation de l'acide urique urinaire et de l'allantoïne chez les femelles traitées et des altérations des concentrations en dopamine, noradrénaline et 5-HT dans le cerveau (Hadrup *et al.*, 2012 cité dans ANSES, 2015 et EFSA, 2016).

Une autre étude par administration orale chez le rat de 90 mg/kg pc d'Ag avec des nanoparticules d'Ag avec ou sans revêtement (diamètre < 20 nm et Ag-PVP diamètre < 15 nm) pendant 28 j montre l'absence d'effet et en particulier de réponse immune non-spécifique lié à la présence ou non d'un revêtement (van der Zande *et al.*, 2012 cité dans ANSES, 2015 et EFSA, 2016).

Dans une autre étude, les rats (mâles et femelles) ont été exposés par gavage à des doses de 100 et 500 mg/kg pc /j de nanoAg (diamètre 15 et 25 nm) pendant 28 j (Lee *et al.*, 2013 cité dans ANSES, 2015). Peu de modifications ont été observées : des augmentations sanguines des enzymes hépatiques alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (AST) chez les femelles et du cholestérol chez les mâles, la présence de gouttelettes lipidiques et de cellules inflammatoires au niveau du foie ainsi que des régénérations tubulaires au niveau des reins.

Dans une étude par voie orale à doses répétées menée selon la ligne directrice OCDE 407, des nanoAg (60 nm) ont été administrées via l'eau de boisson à des rats Sprague-Dawley aux doses de 0 – 30 – 300 – 1 000 mg/kg pc/j pendant 28 jours. Une première analyse a montré qu'une exposition à 300 ou 1 000 mg/kg pc/j induisait des altérations hépatiques légères (Kim *et al.*, 2008 cité dans EFSA, 2016). Dans une analyse complémentaire des mêmes animaux il a été montré que les nanoAg sont un puissant secrétagogue intestinal et induisent 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 *et al.*, 2010 cité dans ANSES, 2015 EFSA, 2016 et OCDE, 2016).

Une autre étude a été menée chez la souris mâle, exposée par gavage à des doses de 5, 10, 15 et 20 mg/kg pc /j pendant 21 j à des nanoAg de 3 à 20 nm, de forme ovale à sphérique. Des diminutions du poids corporel et des altérations intestinales (perte des microvillosités, élargissement de la *lamina propria* et une augmentation de cellules inflammatoires dans la *lamina propria* de l'intestin) sont observées dès 10 mg/kg pc /j (Shahare *et al.*, 2013 cité dans ANSES, 2015 et EFSA, 2016).

Une autre étude est rapportée chez la souris. Il s'agit d'une exposition par voie orale de 14 jours à 1 mg/kg pc /j de nanoparticules de différentes tailles (22 nm, 42 nm and 71 nm). Cette étude montre une altération de différents paramètres immunologiques comme une augmentation dose dépendante des cytokines et une augmentation des cellules B dans les lymphocytes et de la production des Ig-E (Park *et al.*, 2010 cité dans EFSA, 2016)

5.1.2.2 EXPOSITIONS SUB-CHRONIQUE

Dans une étude par voie orale à doses répétées menée selon la ligne directrice OCDE 408, des nanoAg enrobées de citrate ont été administrées via l'eau de boisson à des rats Sprague-Dawley aux doses de 0 – 25 – 100 – 400 mg/kg pc/j pendant 90 jours. Aucun effet néfaste significatif ou de mortalité n'a été observé au cours de cette étude. Seule une légère diminution des triglycérides sériques et une augmentation du taux de bilirubine totale chez les animaux traités ont été observées sans relation dose effet (OCDE, 2016).

Dans une étude combinée à dose répétée et de screening pour la toxicité sur le développement et la reproduction menée selon la ligne directrice OCDE 422, des nanoAg enrobées de citrate (7,9 nm) ont été administrées quotidiennement via l'eau de boisson à des rats Sprague-Dawley aux doses de 0 – 62,5 – 125 – 250 mg/kg pc/j pendant 42 jours pour les mâles et 52 jours pour les femelles. Aucun effet néfaste statistiquement significatif ou mortalité n'a été observé (Hong *et al.*, 2014 citée dans OCDE, 2016).

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) (Ebabe Elle *et al.*, 2013 cité dans ANSES, 2015). Cette étude montre des diminutions de poids corporel des augmentations de certains paramètres biochimiques au niveau sanguin comme le cholestérol et les enzymes hépatiques (ALT), du stress oxydant dans le foie et le cœur et des marqueurs d'inflammation dans le foie.

Une autre étude par doses répétées par voie orale menée selon la ligne directrice OCDE 408 a exposé des rats Fisher 344 à des nanoAg (60 nm) une fois par jour pendant 90 jours aux doses de 0 – 30 – 125 – 500 mg/kg pc/j (Kim *et al.*, 2009 cité dans OCDE, 2016). Les femelles présentent une accumulation élevée de nanoAg dans toutes les régions des reins. Cette accumulation est retrouvée chez les mâles de manière moins marquée. Dans les mêmes conditions expérimentales, une altération dose dépendante dès 125 mg/kg pc /j est observée au niveau hépatique comprenant une augmentation de l'incidence des hyperplasies des canaux biliaires avec ou sans nécrose ou fibrose. Ces effets restent légers. Les auteurs proposent un « No observable adverse effect level » (NOAEL) de 30 mg/kg pc/j et un LOAEL de 125 mg/kg pc/j (Kim *et al.*, 2010 cité dans ANSES, 2015, EFSA, 2016 et OCDE, 2016).

5.2 EFFETS GENOTOXIQUES ET CANCEROGENES

5.2.1 EFFETS GENOTOXIQUES

Les études disponibles montrent des effets génotoxiques clairs lors d'exposition aux nanoAg dans différents systèmes *in vitro* (EFSA, 2016). Il s'agit de lésions primaires de l'ADN, d'effets mutagènes sur cellules de rongeurs et d'aberrations chromosomiques (ANSES, 2015). Ces effets semblent liés essentiellement à l'induction d'espèces réactives de l'oxygène. La libération d'ions Ag à partir des nanoparticules d'argent semble également jouer un rôle même si ce mécanisme semble moins important que l'impact de l'internalisation des nanoparticules (ANSES, 2015).

Les études menées *in vivo* pour des expositions par voie orale ne rapportent pas des résultats aussi clairs et ne permettent pas de conclure quant au potentiel génotoxique des nanoAg (EFSA, 2016). L'ANSES en 2015, considérait de manière plus générale que 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 le test des comètes *in vivo*, les résultats sont contradictoires avec notamment, un test positif (Ghosh *et al.*, 2012) et un test négatif (Cho *et al.*, 2013) par voie respectivement intra-péritonéale et inhalation.

5.2.2 EFFETS CANCEROGENES

Aucune étude standardisée n'est disponible cependant plusieurs études tentent à montrer un rôle anti-angiogène ou antitumoral des nanoparticules d'argent (ANSES, 2015).

5.3 EFFETS SUR LE DEVELOPPEMENT OU LA REPRODUCTION

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 (ANSES, 2015).

Ainsi l'étude de screening par voie orale menée selon la ligne directrice 422 avec des nanoAg enrobées de citrate (7,9 nm) aux doses de 62.5, 125 et 250 mg/kg pc /j ne rapporte pas d'effet sur les paramètres de la reproduction, ni chez le fœtus (Hong *et al.*, 2014 cité dans ANSES, 2015 et OCDE, 2016).

6. CONCLUSION

La présente analyse fait un point sur les principales études disponibles et les principales conclusions proposées par les organismes ayant réalisés des synthèses récentes sur la toxicité des nanoAg (ANSES, 2015 ; EFSA, 2016 ; OCDE, 2016 ; SCENIHR, 2014). Plusieurs dossiers sont en cours d'évaluation à l'European Chemicals Agency (ECHA) mais les données n'étant pas encore publiques à l'issue de la période de l'analyse bibliographique, elles n'ont pas été intégrées ici.

Cette analyse montre que les études retenues par les organismes analysés sont différentes, elles sont dépendantes de la méthode de travail propre à chacun et du but de l'analyse qui a été menée qui peut par exemple correspondre à un type de substance (OCDE) ou d'utilisation (EFSA).

Cette analyse montre que les substances étudiées sont de nature variable (taille, enrobage, ...) et qu'il se dessine difficilement un organe et/ou effet critique. Par ailleurs nous ne disposons d'aucune étude pour des expositions chroniques que ce soit pour des expositions par voie orale ou respiratoire.

Concernant le mécanisme d'action, l'ANSES considère que 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 (ANSES, 2015).

Enfin, il n'existe pas de valeur limite d'exposition professionnelle (Mihalache et al., 2017), ni de valeur toxicologique de référence.

7. BIBLIOGRAPHIE

ANSES (2015) - AVIS et rapport de l'Anses 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'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Maisons-Alfort. <https://www.anses.fr/fr/system/files/AP2011sa0224Ra.pdf>

Cho H., Sung J., Song K., Kim J., Ji J., Lee J., Ryu H., Ahn K. and Yu I. (2013) - Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Lung Cells of Sprague Dawley Rats after 12 Weeks of Inhalation Exposure. *Toxics*, **1**, 1, 36.

Ebabe Elle R., Gaillet S., Vidé J., Romain C., Lauret C., Rugani N., Cristol J.P. and Rouanet J.M. (2013) - Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats: Effects on oxidative stress and inflammation. *Food and Chemical Toxicology*, **60**, Supplement C, 297-301.

EFSA (2016) - Scientific opinion on the re-evaluation of silver (E 174) as food additive. European Food safety Authority. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2016.4364/epdf>.

Ghosh M., J M., Sinha S., Chakraborty A., Mallick S.K., Bandyopadhyay M. and Mukherjee A. (2012) - In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **749**, 1, 60-69.

Hadrup N., Lam H.R., Loeschner K., Mortensen A., Larsen E.H. and 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.

Hong J.-S., Kim S., Lee S.H., Jo E., Lee B., Yoon J., Eom I.-C., Kim H.-M., Kim P., Choi K., Lee M.Y., Seo Y.-R., Kim Y., Lee Y., Choi J. and Park K. (2014) - Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. *Nanotoxicology*, **8**, 4, 349-362.

Jeong G.N., Jo U.B., Ryu H.Y., Kim Y.S., Song K.S. and Yu I.J. (2010) - Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats. *Archives of Toxicology*, **84**, 1, 63.

Ji J.H., Jung J.H., Kim S.S., Yoon J.-U., Park J.D., Choi B.S., Chung Y.H., Kwon I.H., Jeong J., Han B.S., Shin J.H., Sung J.H., Song K.S. and Yu I.J. (2007) - Twenty-Eight-Day Inhalation Toxicity Study of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. *Inhalation Toxicology*, **19**, 10, 857-871.

Kim W.-Y., Kim J., Park J.D., Ryu H.Y. and Yu I.J. (2009) - Histological Study of Gender Differences in Accumulation of Silver Nanoparticles in Kidneys of Fischer 344 Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **72**, 21-22, 1279-1284.

Kim Y.S., Kim J.S., Cho H.S., Rha D.S., Kim J.M., Park J.D., Choi B.S., Lim R., Chang H.K., Chung Y.H., Kwon I.H., Jeong J., Han B.S. and Yu I.J. (2008) - Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. *Inhalation Toxicology*, **20**, 6, 575-583.

Kim Y.S., Song M.Y., Park J.D., Song K.S., Ryu H.R., Chung Y.H., Chang H.K., Lee J.H., Oh K.H., Kelman B.J., Hwang I.K. and Yu I.J. (2010) - Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, **7**, 1, 20.

Lee J.H., Kim Y.S., Song K.S., Ryu H.R., Sung J.H., Park J.D., Park H.M., Song N.W., Shin B.S., Marshak D., Ahn K., Lee J.E. and Yu I.J. (2013) - Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague–Dawley rats. *Particle and Fibre Toxicology*, **10**, 1, 36.

Liu H., Yang D., Yang H., Zhang H., Zhang W., Fang Y., Lin Z., Tian L., Lin B., Yan J. and Xi Z. (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**, Supplement C, 478-486.

Maneewattanapinyo P., Banlunara W., Thammacharoen C., Ekgasit S. and Kaewamatawong T. (2011) - An Evaluation of Acute Toxicity of Colloidal Silver Nanoparticles. *Journal of Veterinary Medical Science*, **73**, 11, 1417-1423.

OCDE (2016) - Dossier on silver nanoparticles - Part 7 - series on the safety of Manufactured Nanomaterials. Organisation for Economic Co-operation and development.

www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/dossieronsilvernanoparticlespart7.htm.

Park E.-J., Bae E., Yi J., Kim Y., Choi K., Lee S.H., Yoon J., Lee B.C. and 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.

SCENIHR (2014) - Final opinion on Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. European Commission - Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_039.pdf.

Shahare B., Yashpal M. and Gajendra (2013) - Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **23**, 3, 161-167.

Song K.S., Sung J.H., Ji J.H., Lee J.H., Lee J.S., Ryu H.R., Lee J.K., Chung Y.H., Park H.M., Shin B.S., Chang H.K., Kelman B. and Yu I.J. (2013) - Recovery from silver-nanoparticle-exposure-induced lung inflammation and lung function changes in Sprague Dawley rats. *Nanotoxicology*, **7**, 2, 169-180.

Stebounova L.V., Adamcakova-Dodd A., Kim J.S., Park H., O'Shaughnessy P.T., Grassian V.H. and Thorne P.S. (2011) - Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model. *Particle and Fibre Toxicology*, **8**, 1, 5.

Sung J.H., Ji J.H., Park J.D., Yoon J.U., Kim D.S., Jeon K.S., Song M.Y., Jeong J., Han B.S., Han J.H., Chung Y.H., Chang H.K., Lee J.H., Cho M.H., Kelman B.J. and Yu I.J. (2009) - Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, **108**, 2, 452-461.

van der Zande M., Vandebriel R.J., Van Doren E., Kramer E., Herrera Rivera Z., Serrano-Rojero C.S., Gremmer E.R., Mast J., Peters R.J.B., Hollman P.C.H., Hendriksen P.J.M., Marvin H.J.P., Peijnenburg A.A.C.M. and Bouwmeester H. (2012) - Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. *ACS Nano*, **6**, 8, 7427-7442.



INERIS

*maîtriser le risque
pour un développement durable*

Institut national de l'environnement industriel et des risques

Parc Technologique Alata
BP 2 - 60550 Verneuil-en-Halatte

Tél. : +33 (0)3 44 55 66 77 - Fax : +33 (0)3 44 55 66 99

E-mail : ineris@ineris.fr - **Internet** : <http://www.ineris.fr>