

**Etat des connaissances relatif aux nanoparticules de
dioxyde de titane et d'oxyde de zinc dans les produits
cosmétiques en termes de pénétration cutanée, de
génotoxicité et de cancérogenèse**

Rapport adopté par la Commission de cosmétologie du 15 mars 2011

Mots clés : Cosmétique, dioxyde de titane, nanomatériaux, oxyde de zinc, produits solaires

Résumé

Le 21 janvier 2008, l'Afssaps a été saisie par la Direction générale de la santé (DGS) sur le thème des nanomatériaux dans les produits cosmétiques, afin de se prononcer sur le risque de toxicité cancérigène voire génotoxique induit par l'utilisation du dioxyde de titane (TiO₂) dans les produits précités, du fait notamment de la classification en février 2006 par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), en catégorie 2B, c'est-à-dire comme potentiellement cancérigène pour l'homme.

Par ailleurs, dans cette saisine du 21 janvier 2008, la DGS a demandé à l'Afssaps de réaliser un état de l'art des connaissances scientifiques disponibles sur le potentiel de pénétration cutanée des nanoparticules (NPs), en particulier le TiO₂ mais aussi l'oxyde de zinc (ZnO) contenus dans les produits appliqués par voie topique.

L'application majeure du TiO₂ et du ZnO dans le domaine de la cosmétique concerne leur utilisation en tant que filtre des rayons ultra-violet (ou filtres UV) inorganiques. Considérant l'utilisation des nanomatériaux de TiO₂ et de ZnO dans les produits cosmétiques et en particulier dans les produits de protection solaire, produits d'application topique, la question d'une possible absorption cutanée engendrant leur distribution dans des organes cibles *via* la circulation sanguine, se pose fortement. Ainsi, dans ce contexte, une revue des études disponibles a été réalisée.

Pénétration percutanée

Les résultats d'un grand nombre d'études de pénétration cutanée *in vitro* et *ex vivo* sur peau animale et humaine rapportées, indiquent une présence des NPs de TiO₂ limitée aux couches supérieures de la peau (*stratum corneum* et *infundibulum* pilosébacé). Néanmoins, ces études ont été réalisées sur des temps courts (72 heures maximum), avec des particules non caractérisées selon les connaissances actuelles en termes de taille, forme cristalline, enrobage, etc. De plus, certaines études n'utilisent pas de protocoles standardisés et validés selon les recommandations du Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs (CSSC) ou l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE).

Une étude récente de la FDA (*Food and Drug Administration* ; Sadrieh *et al.*, 2010) reste à ce jour l'étude pertinente retenue par l'Afssaps pour l'analyse de la pénétration cutanée des NPs de TiO₂. En effet, cette étude :

- est menée *in vivo* ;
- met en jeu l'évaluation de la pénétration cutanée de NPs de TiO₂ représentatives de celles commercialisées pour les produits cosmétiques ;
- est menée sur le mini-porc, espèce qui constitue un modèle approprié pour l'extrapolation des résultats à l'homme en raison des fortes similarités de la peau entre ces deux espèces en termes de perméabilité et de structure cutanées ;
- est menée sur une durée relativement longue avec des applications répétées (application de produits 4 fois par jour, 5 jours par semaine durant 22 jours) comparativement aux autres études issues de la littérature scientifique qui se déroulent sur des temps courts (maximum 72 heures).

Ainsi, Sadrieh *et al.* (2010) concluent à une présence de fortes quantités de NPs de TiO₂ (enrobées et non enrobées) et de particules de TiO₂ submicroniques (300-500 nm) dans le *stratum corneum* et à la présence de quelques particules isolées de TiO₂ dans le derme pour les animaux traités avec les trois types de particules. Par ailleurs, cette étude révèle des quantités statistiquement significatives de TiO₂ dans le ganglion inguinal gauche du groupe traité par des NPs de TiO₂ non enrobées et dans le ganglion inguinal droit du groupe traité par des particules de TiO₂ submicroniques (300-500 nm).

Ces résultats ne permettent pas de conclure de façon définitive à une absence d'absorption systémique chez le mini-porc du fait de la présence de NPs de TiO₂ non enrobées et de particules de TiO₂ submicroniques (300-500 nm) dans les ganglions inguinaux. Il conviendrait donc de quantifier la quantité disponible dans les ganglions inguinaux et de clarifier les mécanismes de pénétration. Il est néanmoins important de rappeler que les NPs de TiO₂ utilisées dans les produits cosmétiques, sont généralement enrobées.

Concernant les NPs de ZnO, peu d'études sont disponibles comparativement à celles disponibles pour les NPs de TiO₂. Des études d'absorption cutanée *in vitro* (modèle de peau animale

et humaine) et chez le volontaire ont été menées montrant la présence des NPs de ZnO limitée aux couches supérieures de la peau (*stratum corneum* voire *stratum granulosum*).

Une étude récente (Gulson *et al.*, 2010) montre une augmentation statistiquement significative des taux en zinc radiomarqué (^{68}Zn) mesurés dans le sang et les urines chez des volontaires traités avec les NPs de ZnO. Néanmoins, cette augmentation reste faible au regard des taux en zinc endogène chez l'homme, d'après les auteurs. Par ailleurs, les auteurs précisent qu'il n'est pas possible de déterminer si le ^{68}Zn a été absorbé sous la forme de particules de ZnO ou sous la forme d'ions Zn^{2+} solubles ou les deux.

En conclusion sur la base des données disponibles, il n'est pas possible de conclure à une absence d'un passage systémique des NPs de ZnO.

Il est important de noter que le ZnO n'est pas inclus à l'annexe VII, partie 1 de la directive cosmétique 76/768/CEE définissant la liste des filtres ultra-violet (UV) pouvant être utilisés dans les produits cosmétiques. Or l'article 4 de la directive cosmétique précitée, point g), précise que les produits cosmétiques ne peuvent pas contenir les filtres ultra-violet autres que ceux énumérés dans la première partie de l'annexe VII.

Les conclusions du présent rapport sont valables pour les peaux saines et non pas lésées. En effet, les résultats rapportés dans la littérature concernant la peau lésée semblent contradictoires et il est probable que toute lésion de la peau de nature pathologique ou d'origine exogène puisse favoriser l'absorption des NPs. Par ailleurs, il a été observé dans quelques études impliquant des NPs autres que les NPs de TiO_2 et de ZnO (par exemple les quantum dots et les fullerènes), qu'il pouvait exister un impact des effets mécaniques (par exemple flexion de la peau) sur la pénétration cutanée, ce qui a pour conséquence une augmentation de la pénétration cutanée se traduisant par la présence de particules dans les couches profondes de l'épiderme et dans le derme.

Génotoxicité

De nombreuses études de génotoxicité montrent des résultats positifs en présence des NPs de TiO_2 et de ZnO avec des mécanismes d'action possibles qui impliqueraient la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) capables d'endommager l'ADN en présence et en l'absence de lumière UV. Les mécanismes proposés dans la littérature seraient probablement communs aux différentes NPs. On peut ajouter que les NPs de TiO_2 présentent des propriétés photocatalytiques (propriétés susceptibles de générer des ERO après exposition aux rayonnements UV) qui seraient aussi impliquées dans la génotoxicité des NPs de TiO_2 .

Les NPs de TiO_2 utilisées dans les produits cosmétiques sont généralement enrobées par des substances organiques ou inorganiques et peuvent être également dopées, afin de diminuer les effets des ERO. De plus, des systèmes antioxydants peuvent être ajoutés dans les formulations. Par ailleurs, la forme cristalline anatase du TiO_2 étant considérée comme la moins photostable, on ne retrouve généralement dans les produits cosmétiques, que la forme rutile ou un mélange anatase/rutile. Toutefois, une étude a montré une réactivité plus importante pour le mélange anatase/rutile par rapport aux formes cristallines anatase et rutile seules (Van der Meulen *et al.*, 2007).

Il est à noter les difficultés de transposer les résultats obtenus dans la littérature avec différents types de NPs qui ne sont pas représentatives de celles pouvant se retrouver dans les formulations des produits cosmétiques commercialisés (produits de protection solaire par exemple). En effet, les études disponibles ne prennent pas en compte l'ensemble des paramètres suscités tels que l'enrobage ou le dopage par exemple, et pouvant être impliqués dans la modulation des réponses.

Toutefois, l'étude récente de Landsiedel *et al.* (2010) est intéressante puisque les NPs utilisées correspondent à des NPs commercialisées pour un usage cosmétique. Cette étude montre de génotoxicité négatifs pour les particules étudiées. Par ailleurs, à la différence de nombreux travaux issus de la littérature scientifique, les particules étudiées sont caractérisées précisément.

A ce stade des connaissances actuelles, il n'est pas possible de conclure de manière générale sur le potentiel génotoxique des NPs utilisées dans les produits cosmétiques enrobées et/ou dopées et il convient de disposer d'études appropriées au cas par cas en fonction des caractéristiques physico-chimiques spécifiques de chaque NP.

Cancérogenèse

Les études de cancérogenèse sont à ce jour limitées quantitativement et qualitativement. Il faut toutefois signaler que des études sur les effets toxicologiques à long-terme ont été réalisées chez l'animal, en particulier par voie respiratoire (instillation intra-trachéale, intra-nasale ou plus rarement exposition par inhalation). Ces études montrent une toxicité pulmonaire chez le rat, se manifestant par la saturation de la clairance pulmonaire accompagnée d'une inflammation pulmonaire chronique, de la production d'espèces réactives de l'oxygène, d'une diminution des mécanismes de défense (antioxydants), d'une altération des cellules, d'une prolifération cellulaire et d'une fibrose. Toutefois, les effets observés ne peuvent être extrapolés à l'homme dans le domaine d'exposition aux produits cosmétiques. En effet, ces études utilisent principalement l'instillation intra-trachéale qui ne reflète pas l'exposition par voie aérienne mimant l'utilisation de « spray » aérosol de protection solaire par exemple. De plus, les NPs de TiO_2 utilisées dans ces études ne sont pas représentatives des NPs de TiO_2 utilisées dans les produits cosmétiques. La voie cutanée reste néanmoins la voie d'exposition majoritaire pour les produits cosmétiques de protection solaire. Toutefois, pour ces mêmes produits, l'utilisation de « sprays » aérosol est courante et il convient de considérer la voie aérienne comme une voie d'exposition possible.

Conclusions et recommandations

Le manque d'études pertinentes et représentatives des nanomatériaux réellement utilisés dans les produits cosmétiques ne permet pas de conclure sur l'innocuité de ces nanomatériaux dans les produits cosmétiques. Néanmoins, au vu des résultats disponibles :

- en se fondant sur l'étude de pénétration cutanée des NPs de TiO_2 de Sadrieh *et al.* (2010) qui conclut à l'absence d'absorption cutanée significative, il convient de quantifier la quantité disponible dans les ganglions inguinaux, de clarifier les mécanismes de pénétration ainsi que l'impact sanitaire ;
- l'absorption cutanée et le franchissement de la barrière cutanée des NPs de ZnO ne peut pas être exclue ;
- la recherche doit continuer dans le domaine de la toxicologie des nanomatériaux utilisés dans les produits cosmétiques afin d'explorer les mécanismes de toxicité à long-terme, notamment sur des NPs enrobées et/ou dopées.

L'Afssaps est consciente des difficultés actuelles relatives à l'évaluation du risque lié à l'utilisation des nanomatériaux en raison du manque de recul nécessaire et des lacunes dans les connaissances scientifiques actuelles suivantes :

- le manque de données toxicologiques suffisantes et mécanistiques permettant de caractériser le danger par voie cutanée, respiratoire et orale ;
- l'absence de données fiables sur les nanomatériaux mis sur le marché dans le domaine des produits cosmétiques ;
- l'absence de protocoles de caractérisation et de détection de ces nanomatériaux, validés à l'échelle internationale.

L'Afssaps estime nécessaire la réalisation d'études complémentaires :

- de pénétration cutanée mettant en jeu des NPs de ZnO et de TiO_2 de formules représentatives du marché des produits cosmétiques afin de confirmer les résultats retrouvés dans les autres études et apporter des explications sur les lacunes actuelles y compris sur les mécanismes de pénétration ;
- de toxicologie à long terme par voies cutanée, orale et aérienne de NPs parfaitement caractérisées utilisées en cosmétique (par exemple, avec l'enrobage et/ou le dopage) ;
- de stabilité des NPs enrobées et/ou dopées utilisées dans le domaine cosmétique, pour chaque étude de toxicologie.

De plus, des études de pénétration cutanée sur peau lésée des NPs représentatives de celles utilisées dans les produits cosmétiques, sont nécessaires afin d'évaluer le risque pour l'homme en cas d'exposition systémique. En effet, la directive cosmétique 76/768/CEE précise à l'article 2, que les produits cosmétiques mis sur le marché à l'intérieur de la Communauté ne doivent pas nuire à la santé humaine lorsqu'ils sont appliqués dans les conditions normales ou raisonnablement prévisibles d'utilisation. Or, l'érythème solaire constituant une peau lésée, est représentatif d'un schéma

d'utilisation raisonnablement prévisible d'un produit de produit de protection solaire. En absence de ces informations, il convient de recommander de ne pas utiliser sur peau lésée les produits cosmétiques contenant les nanomatériaux de TiO_2 et de ZnO .

Par ailleurs, en l'absence de données toxicologiques permettant de caractériser le danger par voie respiratoire d'une part et par précaution d'usage comme pour tout produit chimique d'autre part, l'Afssaps recommande de ne pas utiliser les produits contenant ces nanomatériaux en « sprays » aérosol ou en poudre sur le visage mais également quand les produits précités sont utilisés dans des locaux fermés.

Enfin, l'Afssaps estime que l'innocuité des nanomatériaux devra être évaluée au cas par cas dans les conditions d'utilisation des produits cosmétiques concernés.

Sommaire

RESUME	2
SOMMAIRE.....	6
ABREVIATIONS.....	8
LISTE DES TABLEAUX	9
PARTIE 1 : LES NANOMATERIAUX DANS LES PRODUITS COSMETIQUES.....	10
1. PRESENTATION DE LA SAISINE.....	10
1.1. CONTEXTE	10
1.2. OBJET DE LA SAISINE	10
1.3. MODALITES DE TRAITEMENT DE LA SAISINE	11
2. DEFINITIONS ET CADRE REGLEMENTAIRE.....	12
2.1. DEFINITIONS DES NANOMATERIAUX	12
2.2. RÉGLEMENTATION EN MATIÈRE DE NANOMATÉRIAUX DANS LES PRODUITS COSMÉTIQUES.....	13
3. ETAT DU MARCHÉ DES NANOMATÉRIAUX DANS LES PRODUITS COSMÉTIQUES.....	14
3.1. DONNÉES EN LIGNE SUR INTERNET	14
3.2. DONNÉES FOURNIES PAR LES REPRÉSENTANTS DE L'INDUSTRIE COSMÉTIQUE EN FRANCE	15
4. SPÉCIFICITÉ DE L'ÉVALUATION DE LA SÉCURITÉ DES NANOMATÉRIAUX.....	16
4.1. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES NANOMATÉRIAUX.....	16
4.1.1. <i>Taille et forme</i>	16
4.1.2. <i>La surface</i>	16
4.2. CARACTÉRISATION DU DANGER ET DE L'EXPOSITION DE LA POPULATION GÉNÉRALE	16
PARTIE 2 : ETUDES RELATIVES AUX NANOPARTICULES DE TIO₂ ET DE ZNO DANS LE DOMAINE COSMETIQUE	18
1. GENERALITES SUR LE DIOXYDE DE TITANE ET L'OXYDE DE ZINC.....	18
2. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE ET D'OXYDE DE ZINC DANS LES PRODUITS COSMETIQUES.....	19
3. ROLE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	19
3.1. TAILLE DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE	19
3.2. PHOTOSTABILITE ET ENROBAGE/DOPAGE.....	20
3.3. DISPERSION ET PH	20
3.4. AUTRES PARAMETRES.....	21
3.5. RESUME DES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES	21
4. ETUDES D'ABSORPTION CUTANEE	22
4.1. DONNEES IN VITRO	22
4.1.1. <i>Modèle de peau animale</i>	22
4.1.2. <i>Modèle de peau humaine</i>	23
4.1.3. <i>Conclusions sur l'absorption cutanée in vitro</i>	24
4.2. DONNEES IN VIVO	24
4.2.1. <i>Animal</i>	24
4.2.2. <i>Homme</i>	27
4.2.3. <i>Cas particuliers : études sur peaux lésées (études in vitro et in vivo)</i>	29
4.2.4. <i>Conclusions sur l'absorption cutanée in vivo</i>	30
5. ETUDES DE GENOTOXICITE	31
5.1. ETUDE DU POTENTIEL GENOTOXIQUE	31
5.2. ETUDE DU MECANISME DE GENOTOXICITE	35

5.3.	ETUDES D'EFFICACITE DES ENROBAGES DES NANOPARTICULES : PREVENTION DES EFFETS GENOTOXIQUES	39
5.4.	CONCLUSIONS SUR LA GENOTOXICITE	40
6.	ETUDES DE CANCEROGENESE	41
6.1.	CONCLUSIONS SUR LES ETUDES DE CANCEROGENESE	41
7.	ETUDES DE TOXICITE REPETEE	42
7.1.	DONNEES METTANT EN JEU LA VOIE RESPIRATOIRE	42
7.2.	DONNEES METTANT EN JEU LA VOIE CUTANEE	42
7.3.	CONCLUSIONS SUR LES ETUDES DE TOXICITE REPETEE	43
8.	DISCUSSION, CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	44
8.1.	DISCUSSION ET CONCLUSIONS	44
8.2.	RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	46
	BIBLIOGRAPHIE.....	48
	ANNEXE 1 : DONNEES DE CARACTERISATION ET D'UTILISATIONS DES NANOMATERIAUX DANS LES PRODUITS COSMETIQUES FOURNIES PAR LES ADHERENTS DE FEBEA (D'APRES FEBEA, SONDAGE REALISE EN 2008)	53
	ANNEXE 2 : GENERALITES SUR LA STRUCTURE CUTANEE	54

Abréviations

Afssaps : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
Afsset : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
 Al_2O_3 : Oxyde d'aluminium
Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail
AO : Acide oléique
BET : Brunauer-emmett-teller nitrogen-gas absorption method
CAS : Chemical abstract services
CE : Communauté européenne
CIRC : Centre international de recherche contre le cancer
CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance
COSMED : Cosmétiques Méditerranée, l'association de la filière cosmétique
CSSC : Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs
DCI : Dénomination commune internationale
DEPPCB : Direction de l'évaluation de la publicité, des produits cosmétiques et biocides
DGS : Direction générale de la santé
DIE : Direction de l'inspection des établissements
DMSO : Diméthylsulfoxyde
 TiO_2 : Dioxyde de titane
EDX : Energy dispersive X-ray
EFSA : European food safety authority
EINECS : European inventory of existing commercial chemical substances
ELINCS : European list of notified chemical substances
EMS : Ethylméthylsulfonate
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
ESR : Electron spin resonance
FAO : Food and agriculture organisation of the united nations
FEBEA : Fédération des entreprises de la beauté
FIP : Fédération des industries de la parfumerie
HPRT : Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
IARC : International agency for research on cancer
ICCR : International cooperation on cosmetic regulation
ICP-MS : Inductively coupled plasma mass spectroscopy
ISO : Organisation internationale de normalisation
IUPAC : International union of pure and applied chemistry
LDH : Lactate déshydrogénase
MDA : Malondialdéhyde
MEB : Microscopie électronique à balayage
MET : Microscopie électronique à transmission

MBBT : Méthylène bis-benzotriazolyl tetramethylbutyl phenol
MC-ICP-MS : Multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry
MgO : Oxyde de magnésium
MTS : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tetrazolium
MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tetrazolium bromide
NAC : N-acétyl-cystéine
NIOSH : National institute for occupational safety and health
NPs : Nanoparticules
OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques
•OH : Radical hydroxyle
8-oxoGua : 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-hydroxyguanine)
PAL : Phosphatases alcalines
PBS : Phosphate buffer saline
pc. : poids corporel
PCS : Photon correlation spectroscopy
PIXE : Particle induced X-ray emission
RBS : Rutherford backscattering spectrometry
REACH : Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemical substances
SAA : Spectrométrie d'absorption atomique
SCCP : Scientific committee on consumer products
SCCS : Scientific committee on consumer safety
SLS : Sulfate de lauryle sodium
SCENIHR : Scientific committee on emerging and newly identified health risks
STIM : Scanning transmission ion microscopy
SVF : Sérum de veau fœtal
TiO₂ : Dioxyde de titane
UV : Ultra-violet
XRD : X ray diffraction
ZnO : Oxyde de zinc

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des différents types de NPs de TiO ₂ évalués	37
--	----

Partie 1 : Les nanomatériaux dans les produits cosmétiques

1. Présentation de la saisine

1.1. Contexte

Le domaine des nanotechnologies constitue un secteur en plein essor depuis une vingtaine d'années. L'intérêt porté aux nanomatériaux repose sur des propriétés inhérentes à leurs dimensions et à leur forme. Ainsi, la modification de la taille et de la forme des matériaux confère une amélioration de leurs propriétés physiques voire l'apparition de nouvelles propriétés non observées avec des matériaux de taille conventionnelle.

Les nanomatériaux sont utilisés dans des domaines tels que l'informatique ou la téléphonie mobile mais également dans les secteurs de la santé, de l'alimentation, du textile, de l'automobile, du bâtiment, du sport ou des produits cosmétiques.

Bien que constituant une avancée majeure au niveau des progrès technologiques, les nanomatériaux suscitent des interrogations de la part de la communauté scientifique, des autorités et de la population générale vis-à-vis de la santé humaine. En effet, il est généralement admis en toxicologie, que les effets sont liés à la dose de substance à laquelle l'homme est exposé. Ainsi, plus la dose de produit à laquelle l'homme est exposé est conséquente, plus les effets toxiques observés seront sévères. Or, dans le cas des nanomatériaux, les effets observés ne sont pas nécessairement corrélés à la dose administrée. Il est avéré que pour certains nanomatériaux à quantité égale, il est possible d'observer des effets toxiques différents et/ou plus sévères que ceux observés avec ces mêmes matériaux non réduits à l'échelle nanométrique.

1.2. Objet de la saisine

L'Afssaps a été saisie le 26 mai 2005 par la Direction générale de la santé (DGS), afin d'établir la liste de catégories de produits relevant de sa compétence (notamment médicaments à usage humain, produits cosmétiques, dispositifs médicaux) contenant des nanoparticules, de quantifier leur utilisation et de procéder à une évaluation des risques pour la santé humaine.

Concernant les médicaments, un groupe de travail « Innovation Non Clinique » a été créé par décision du Directeur général de l'Afssaps en date du 22 juillet 2004 (décision DG 2004-207). Ce groupe de travail est chargé d'étudier et d'évaluer les aspects méthodologiques et techniques des nouvelles approches utilisées en toxicologie en vue de les valider et de définir leurs règles de bon usage pour leur éventuelle utilisation dans le cadre de l'évaluation des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché ainsi que de donner à la demande du Directeur général un avis dans l'évaluation de certains dossiers. Dans le cadre de ses missions et suite à la saisine de la DGS relative aux médicaments sous forme nanoparticulaire, le groupe de travail a émis une série de recommandations relatives à l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire¹.

Il est à noter que le présent rapport n'est relatif qu'aux nanomatériaux contenus dans les produits cosmétiques.

Le 10 avril 2006, l'Afssaps a rédigé une note à l'attention de la DGS en réponse à la saisine du 26 mai 2005. Concernant les produits cosmétiques, cette note s'est appuyée sur les travaux la commission de cosmétologie. Celle-ci a effectué un état des lieux relatif à l'utilisation des nanomatériaux dans les produits cosmétiques et évalué l'impact en termes de santé publique d'un risque éventuel lié à l'utilisation de ce type de substances. Les délibérations et l'avis rendus en réunion plénière du 29 septembre 2005, ont montré qu'en l'état des connaissances d'alors, les éléments mis à disposition de la commission ne permettaient pas de conclure à l'existence ou non d'un risque lié aux nanomatériaux.

¹ Afssaps. (septembre 2008). Recommandations relatives à l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire. En ligne : http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/ac7d242fbecb3c8ab0a7363fbc9a4ec.pdf

Le 21 janvier 2008, l'Afssaps a été saisie une deuxième fois par la DGS sur le thème des nanomatériaux dans les produits cosmétiques, afin de se prononcer sur le risque de toxicité cancérogène voire génotoxique induit par l'utilisation du dioxyde de titane (TiO₂) dans les produits précités, du fait notamment de la classification en février 2006 par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), en catégorie 2B, c'est-à-dire comme potentiellement cancérogène pour l'homme.

Par ailleurs, dans cette saisine du 21 janvier 2008, la DGS a demandé à l'Afssaps de réaliser un état de l'art des connaissances scientifiques disponibles sur le potentiel de pénétration cutanée des nanoparticules (NP), en particulier le TiO₂ mais aussi l'oxyde de zinc (ZnO) contenus dans les produits appliqués par voie topique.

1.3. Modalités de traitement de la saisine

A la suite des conclusions de la commission de cosmétologie du 29 septembre 2005 et en l'absence de données pertinentes disponibles sur les nanomatériaux et leur sécurité dans les produits cosmétiques, l'Afssaps a demandé aux deux organisations représentatives de l'Industrie cosmétique françaises (Fédération des industries de la parfumerie (FEBEA), et l'association de la filière cosmétique (COSMED) par courrier du 15 juin 2007 de lui fournir les données suivantes concernant les nanomatériaux dans les produits cosmétiques :

- leur recensement et leur caractérisation ;
- les données relatives à leur sécurité ;
- les méthodes d'évaluation des risques dans le cadre d'une exposition par voie cutanée ou par inhalation ;
- et les méthodes d'analyse et de contrôle qualité.

FEBEA et COSMED ont répondu par courriers du 11 et 14 septembre 2007 respectivement.

Un groupe de travail *ad hoc* de l'Afssaps réunissant des experts dans le domaine des nanomatériaux a ensuite été créé et s'est réuni une première fois le 6 novembre 2007. Au cours de cette première réunion, des toxicologues de l'Industrie cosmétique française ont été auditionnés et ont pu exposer leur point de vue concernant la définition et la sécurité des nanomatériaux dans les produits cosmétiques. A la suite des débats et discussions de ce groupe *ad hoc* relatif aux nanomatériaux dans les produits cosmétiques, l'Afssaps a demandé *via* un courrier daté du 7 février 2008 à FEBEA et COSMED de lui fournir des données supplémentaires :

- les catégories de produits cosmétiques renfermant des nanomatériaux d'origine minérale ;
- parmi ces produits la part :
 - d'aérosols et de «sprays» renfermant du TiO₂ et/ou du ZnO sous forme de nanomatériaux ;
 - de ceux destinés à des populations sensibles (par exemples les nourrissons) et ceux destinés à des zones spécifiques d'application ;
- et les données toxicologiques disponibles, y compris les études des fournisseurs de matières premières et les données d'absorption cutanée.

FEBEA et COSMED ont répondu par courriers du 14 et 17 mars 2008 respectivement.

Le groupe *ad hoc* a ensuite été intégré au groupe de travail «Ingrédients» auprès de la commission de cosmétologie de l'Afssaps et s'est réuni quatre fois sur le sujet des nanomatériaux dans les produits cosmétiques, le 20 mars, le 3 juin, le 16 septembre et le 25 novembre 2008.

Par ailleurs, l'Afssaps a aussi demandé aux fournisseurs de matières premières à usage pharmaceutique et susceptibles de fournir aussi des matières premières à usage cosmétique, par courrier en date du 13 août 2008, de lui fournir les éléments de caractérisation physico-chimiques et les données de sécurité des nanomatériaux utilisés par les fabricants de produits cosmétiques.

De plus, l'Afssaps a demandé à la FEBEA, par courrier datant du 22 janvier 2009 de lui transmettre les études réalisées par le COLIPA, l'association européenne des industries cosmétiques, sur le TiO₂, suite à la demande du Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs (CSSC)². La FEBEA a répondu à cette demande le 25 février 2009, en précisant que les études demandées par le CSSC n'étaient pas en sa possession.

² Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), anciennement SCCP, Scientific Committee on Consumer Products.

Par ailleurs, un rapport de synthèse de l'état des lieux des connaissances et des informations sur les nanomatériaux, en réponse à la saisine du 21 janvier 2008, a été envoyé le 26 juin 2009 comme point d'étape à la DGS. Enfin, la DGS a été tenue informée que l'Afssaps continuait de travailler sur les nanomatériaux utilisés dans les produits cosmétiques, en vue d'établir un rapport d'évaluation.

Le présent rapport se fonde sur les connaissances actuelles afin de tenter d'évaluer le risque potentiel lié à l'utilisation du TiO_2 et du ZnO sous forme nanométrique dans les produits cosmétiques. Un état des lieux relatif aux définitions et à la réglementation actuelle des nanomatériaux contenus dans les produits cosmétiques est présenté. De plus, une liste des nanomatériaux utilisés dans les produits cosmétiques est exposée au regard des données présentes dans la littérature d'une part et des données fournies par les industriels (FEBEA et COSMED) d'autre part. Enfin, il est procédé à l'analyse critique des études de pénétration cutanée du TiO_2 et du ZnO sous forme nanométrique et des études toxicologiques disponibles (en particulier la génotoxicité et la cancérogenèse).

2. Définitions et cadre réglementaire

2.1. Définitions des nanomatériaux

Actuellement, aucune définition des nanomatériaux au niveau international, quelque soit le domaine d'application, n'est harmonisée. Ce rapport étant relatif aux nanomatériaux dans les produits cosmétiques, il s'attachera à exposer la définition des nanomatériaux telle qu'elle apparaît dans la réglementation cosmétique.

Ainsi, le règlement cosmétique³ présente au Chapitre I, Article 2, point k), la définition des nanomatériaux comme suit :

« un nanomatériau est 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 ». Il est à noter que ce règlement cosmétique stipule que cette définition est susceptible d'évoluer selon l'état des connaissances.

Par ailleurs, le CSSC propose également une définition (SCCP, 2007) :

- *des nanoparticules* : particules ayant au moins une dimension à l'échelle nano (une dimension < 100 nm). Les nanoparticules se distinguent selon 2 groupes : i) solubles et /ou dégradables lorsqu'elles sont appliquées sur la peau (liposomes, microémulsions, nanoémulsions) et ii) les particules insolubles (TiO_2 , fullerènes, quantum dots),
- *des nanomatériaux* : matériaux ayant une ou plusieurs dimensions externes ou structure interne à l'échelle nano, qui pourrait lui conférer de nouvelles propriétés par rapport au même matériau sans caractéristiques nano.

Il est à noter que récemment l'ICCR (*International Cooperation on Cosmetic Regulation*, 2010) a publié un rapport relatant les critères et méthodes de détection des nanomatériaux dans les produits cosmétiques. Ce rapport présente également la définition des nanomatériaux dans les produits cosmétiques. Ainsi, il indique : « une substance utilisée dans un cosmétique est considérée comme étant un nanomatériau s'il s'agit d'un ingrédient insoluble, délibérément fabriqué, dont au moins une dimension est de l'ordre de 1 à 100 nanomètres dans la formulation finale, qui est suffisamment stable et persistant dans un milieu biologique pour permettre une interaction éventuelle avec des systèmes biologiques. »

Récemment, le Comité scientifique européen pour les nouveaux risques émergents (*Scientific committee on emerging and newly identified health Risks*, SCENIHR) discute dans son dernier draft (SCENIHR, 2010) des différentes bases scientifiques nécessaires à la définition des nanomatériaux et met en exergue qu'actuellement toutes les définitions existantes mettent en jeu une gamme de taille comprise entre 1 et 100 nm, qui reste empirique et n'est basée sur aucun fondement scientifique.

³ RÈGLEMENT (CE) N° 1223/2009 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques.

Il est à noter que de nombreux travaux sont en cours au niveau de différentes instances réglementaires, notamment au niveau de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) qui travaille sur la définition des nano-objets et publiera prochainement ses propositions de définitions.

Au sujet de la sécurité sanitaire des nanomatériaux solubles ou dégradables, leur toxicité ne diffère pas des matériaux microstructurés. En effet, le CSSC a rendu un avis sur la question (SCCP, 2007) et précise que malgré leur pénétration au niveau de la peau non lésée, les nanomatériaux solubles se désintègrent généralement en leurs composants moléculaires et perdent ainsi leurs caractéristiques relatives à leur taille nano. Le CSSC souligne cependant dans son rapport, que ces nanomatériaux solubles peuvent modifier l'absorption et par conséquent la biodisponibilité et le profil toxicologique des ingrédients actifs dispersés. Il est donc nécessaire de prendre cette particularité en compte lors de l'évaluation de la sécurité sanitaire des nanomatériaux.

2.2. Réglementation en matière de nanomatériaux dans les produits cosmétiques

Le règlement 1223/2009 du 30 novembre 2009 du Parlement européen et du Conseil prévoit en son sein des dispositions spécifiques concernant les nanomatériaux :

1. une définition des nanomatériaux adaptable au progrès technique et scientifique. On entend par nanomatériau *« 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 »* ;
2. la notification centralisée des produits mis sur le marché par le biais d'une interface électronique auprès de la Commission européenne (CE) avec transmission de certaines informations par la Personne Responsable. Parmi celles-ci, doit être mentionnée la présence de substances sous forme de nanomatériaux entrant dans la composition du produit cosmétique. Ces nanomatériaux doivent être identifiés par leur nom chimique (IUPAC) ou par d'autres nomenclatures telles que spécifiées au point 2 du préambule des annexes. Leurs conditions d'exposition raisonnablement prévisibles sont en outre précisées. Ces dispositions s'appliquent à partir du 11 juillet 2013 sauf dispositions transitoires prévues à compter du 11 janvier 2012 ;
3. l'étiquetage de tout ingrédient sous la forme d'un nanomatériau entrant dans la composition du produit cosmétique. A cet égard, dans la liste des ingrédients, le nom de l'ingrédient est suivi du mot « nano » entre crochets ;
4. conformément à l'article 16, un régime de notification spécifique est prévu pour les produits **contenant des nanomatériaux 6 mois avant leur mise sur le marché**. Il s'applique aux nanomatériaux qui :
 - a) ne sont ni des colorants, ni des filtres ultra violets, ni des conservateurs réglementés (sauf spécification contraire) ;
 - b) ne sont pas conformes aux dispositions de l'annexe III (liste des substances soumises à restriction).

Les informations notifiées par la personne responsable comprennent au minimum les éléments suivants :

- c) l'identification du nanomatériau, y compris son nom chimique (IUPAC) et d'autres nomenclatures telles que spécifiées au point 2 du préambule des annexes II à VI ;
- d) la spécification du nanomatériau, y compris la taille des particules et les propriétés physiques et chimiques ;
- e) une estimation de la quantité de nanomatériau contenue dans les produits cosmétiques destinés à être mis sur le marché chaque année ;
- f) le profil toxicologique du nanomatériau ;
- g) les données relatives à la sécurité du nanomatériau, liées à la catégorie du produit cosmétique dans lequel il est utilisé ;
- h) les conditions d'exposition raisonnablement prévisibles.

Ces informations peuvent être notifiées par une tierce personne désignée par la personne responsable qui en informe la Communauté européenne (CE). Il est à noter que le **CSSC peut être amené à évaluer le risque de ces nanomatériaux notifiés sur demande de la CE**, dans un délai de 6 mois après dépôt d'un dossier complet.

En tenant compte de l'avis du CSSC, et lorsqu'il existe un risque potentiel pour la santé humaine, y compris lorsque les données sont insuffisantes, la CE peut soumettre à restriction l'utilisation de l'ingrédient sous forme nanomatériau ou l'interdire.

On distingue 2 situations découlant de ces dispositions :

Les produits mis sur le marché avant le 11 janvier 2013 doivent être notifiés à la CE entre le 11 janvier et le 11 juillet 2013.

Les produits destinés à être mis sur le marché après le 11 janvier 2013 pourront l'être à partir du 11 juillet 2013, 6 mois après leur notification sous réserve de la procédure d'évaluation éventuelle évoquée précédemment.

5. **la publication d'un catalogue** par la CE 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 est prévue au plus tard le 11 janvier 2014 ;
6. **un rapport de situation annuel** est présenté au Parlement européen et au Conseil au plus tard le 11 juillet 2014 : celui-ci fournit des informations sur les développements concernant l'utilisation de nanomatériaux dans les produits cosmétiques dans la Communauté européenne, y compris ceux qui sont utilisés comme colorants, filtres ultraviolets et agents conservateurs, mentionnés dans une section séparée. La mise à jour du rapport dresse la liste, en particulier, des nouveaux nanomatériaux présents dans les nouvelles catégories de produits cosmétiques, indique le nombre de notifications, les progrès accomplis en matière de développement de méthodes d'évaluation spécifiques aux nanomatériaux et de lignes directrices relatives aux évaluations de la sécurité, et fournit des informations sur les programmes de coopération internationale ;
7. un premier réexamen des dispositions relatives aux nanomatériaux est effectué par la CE, en tenant compte des progrès scientifiques au plus tard le 11 juillet 2018.

3. Etat du marché des nanomatériaux dans les produits cosmétiques

3.1. Données en ligne sur Internet

L'Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses, fusion de l'Agence de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) et de l'Agence de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset)) a réalisé un état du marché des nanomatériaux dans son rapport « Evaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et l'environnement » (Afsset, 2010). Il en ressort que, d'après le *Woodrow Wilson Institute* dans le cadre du *NanoTech Project*⁴, dans sa dernière mise à jour du 25 juin 2009, plus de 1000 nano-produits sont sur le marché au niveau mondial. La catégorie la plus importante au niveau des nano-produits concerne la catégorie « santé et fitness » parmi laquelle figurent la sous-catégorie :

- des produits cosmétiques (137 produits répertoriés) ;
- des produits de soin personnel (sous-catégorie qui inclut les compléments alimentaires et les produits cosmétiques) qui présente 193 produits répertoriés et ;
- des crèmes solaires (33 produits répertoriés).

⁴Woodrow Wilson Institute. (Dernière mise à jour, 25 juin 2009). NanoTech Project : Analysis. En ligne : http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/

Les sous-catégories des domaines de la cosmétologie et des produits de soin personnel comptent parmi les plus importantes dans cet inventaire.

Par ailleurs, la base de données américaine *Skin Deep Cosmetic Safety database*⁵ permet de savoir quels produits cosmétiques vendus aux Etats-Unis contiennent des nanomatériaux et quels types de nanomatériaux sont mis en jeu.

Ces données ont été établies à l'échelle internationale. Il n'est pas obligatoire de déclarer les produits contenant des nanomatériaux et il n'existe pas à ce jour de base de données établie à l'échelle nationale. Ainsi, il est possible que ces chiffres soient sous-estimés. Néanmoins, il est important de noter que la Communauté européenne prévoit la publication d'un catalogue de tous les nanomatériaux dans les produits cosmétiques mis sur le marché (y compris les colorants, les filtres UV et les agents conservateurs).

3.2. Données fournies par les représentants de l'Industrie cosmétique en France

Les deux représentants de la profession (FEBEA et COSMED) ont été interrogés *via* différents courriers au sujet des nanomatériaux contenus dans les produits cosmétiques commercialisés par leurs adhérents autant en termes de caractérisation physico-chimique, qu'en termes de sécurité sanitaire et de méthodologie de quantification de ces nanomatériaux (§1.3.).

Les réponses des deux organisations représentatives de l'Industrie cosmétique française *via* les résultats du sondage transmis à leurs adhérents montrent que plusieurs types de nanomatériaux sont utilisés dans les produits cosmétiques dont principalement le TiO_2 et le ZnO . Des nanomatériaux solubles (exemples : liposomes, nanoémulsions) sont également utilisés dans les produits cosmétiques mais comme présenté précédemment (§2.1.), ces derniers ne rentrent pas dans la catégorie de nanomatériaux objets de cette saisine.

Il est à noter que COSMED n'a pas précisé la taille des nanomatériaux utilisés mais a indiqué la nature des nanoparticules minérales et organiques présentes dans les produits cosmétiques commercialisés par leurs adhérents et qui sont les suivantes :

- dioxydes : de titane et de fer ;
- oxydes de zinc, d'argent et d'or ;
- actif dans un polymère (exemple : acétylthéophyllinate et alginate de méthylsilanetriol sur copolymère styrène/acrylate) et ;
- nanoémulsions de phospholipides et autres actifs.

COSMED précise dans sa réponse que ces nanomatériaux sont contenus dans des préparations obtenues généralement par voie aqueuse, mais aussi par voie gazeuse ou encore par broyage, et que toutes les formes galéniques peuvent renfermer des nanomatériaux.

Le tableau de l'annexe 1 synthétise les données de caractérisation et d'utilisation des nanomatériaux dans les produits cosmétiques, transmises par FEBEA *via* un sondage réalisé auprès de ses adhérents. Ainsi, plusieurs types de nanomatériaux sont utilisés dans les produits cosmétiques, et ceci concerne diverses catégories de produits, tels que les produits de protection solaire, les crèmes et émulsions pour la peau, les produits de maquillage et les dentifrices. Il est précisé par les représentants de l'Industrie cosmétique française, que les nanomatériaux sont utilisés comme colorants, filtres UV, épaississants ou dispersants. Ces nanomatériaux peuvent être utilisés avec ou sans enrobage. L'enrobage est réalisé avec des substances admises dans les produits cosmétiques. Ces nanomatériaux forment ensuite des agrégats de taille variable, la taille des agrégats dépendant du milieu de dispersion et donc de la formulation du produit fini.

Les représentants de l'Industrie cosmétique française n'ont pas apporté d'informations sur la question de la proportion de « sprays » et d'aérosols renfermant des nanomatériaux et notamment du TiO_2 et/ou du ZnO sous forme nanométrique.

Concernant les fournisseurs de matières premières à usage cosmétique, sur 38 fournisseurs interrogés, seuls 17 ont répondu. Onze d'entre eux ont indiqué ne fabriquer aucun nanomatériau. Quatre fournisseurs ont indiqué n'être que des distributeurs et qu'ils allaient interroger leurs propres fournisseurs. Un fabricant, qui est aussi un distributeur, a indiqué à l'Afssaps qu'il disposait de

⁵ Skin Deep Cosmetic Safety database (2010). En ligne : <http://www.cosmeticsdatabase.com/>

certificats conformes à la monographie de la Pharmacopée européenne sans tests relatifs aux nanomatériaux et sans spécifications particulières. Un fabricant a déclaré produire des liposomes, micelles et nanoémulsions.

4. Spécificité de l'évaluation de la sécurité des nanomatériaux

La particularité des caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux constitue la base de leur essor dans de nombreux domaines mais également le point de départ de la difficulté d'évaluation de leur sécurité sanitaire.

4.1. Caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux

4.1.1. Taille et forme

Un grand nombre de définitions des nanoparticules présentées par différentes organisations, au niveau national ou international, comprennent le détail d'un domaine de taille. En effet, ce domaine de taille est nécessaire afin de distinguer les nanomatériaux des matériaux microstructurés (JRC, 2010). Elle se situe généralement entre 1 et 100 nm, comme il a été vu dans les définitions données dans le règlement cosmétique (§ 2.1.). Cette gamme de taille implique toutefois le fait que tout matériau dont la taille des particules est supérieure à 100 nm n'est pas considéré comme nanomatériau et donc que la démarche d'évaluation des risques reste une démarche «classique» d'évaluation. Or, certains nanomatériaux dont la taille est supérieure de quelques nanomètres par rapport à la limite haute de cette gamme de taille peuvent conserver leurs propriétés nano. Ainsi, la définition relative à la taille pourrait poser question en termes de caractérisation physico-chimique et de sécurité sanitaire des nanomatériaux.

Outre la taille, la forme des nanomatériaux influence les effets toxiques qui peuvent être observés après exposition à ces derniers. A titre d'exemple, le TiO_2 peut être retrouvé sous plusieurs formes cristallines (anatase, rutile et brookite) qui ne possèdent pas les mêmes propriétés physico-chimiques et toxicologiques.

4.1.2. La surface

L'augmentation relative de la surface ou le rapport élevé surface/volume et les effets quantiques constituent les principales sources de différence de propriétés (optiques, électriques et magnétiques,...) entre les nanomatériaux et les matériaux microstructurés (SCCP, 2007). En effet, à masse égale, la réduction de la taille de particule résulte en l'accroissement de la surface totale. Ainsi, plus une particule est petite et plus elle sera réactive en raison de l'augmentation du rapport surface/volume. Une corrélation entre l'augmentation du rapport surface/volume et des effets biologiques a été démontrée dans de nombreux cas issus de la littérature scientifique mais il existe également des cas où la relation entre la taille, le rapport surface/volume augmenté et l'accroissement des effets toxiques, n'est pas aussi évidente, voire même une observation d'effets toxiques de moindre gravité par rapport à ceux observés avec des matériaux microstructurés (SCCP, 2007).

D'autres propriétés physico-chimiques sont à prendre en compte lors de l'évaluation des risques, telles que l'arrangement de leurs cristaux, l'état énergétique de leur surface, l'existence d'un revêtement ou de contaminants sur les surfaces, leur capacité à s'agréger et/ou s'agglomérer, etc. Il est à noter que l'agglomération/agrégation de nanomatériaux peut aboutir à des matériaux dont la taille est supérieure à 100 nm ; toutefois ces agglomérats conservent leurs propriétés nano (SCENIHR, 2009). Tous ces paramètres sont difficiles à mettre en œuvre même si actuellement les précisions des méthodes de détection des nanomatériaux sont en progression constante, permettant ainsi une meilleure caractérisation et évaluation de l'exposition.

4.2. Caractérisation du danger et de l'exposition de la population générale

A ce jour, les méthodes de détection et le dosage spécifiques des nanomatériaux ne sont pas harmonisées. Comme constaté précédemment, le marché des nanomatériaux reste mal connu. La déclaration de la présence de nanomatériaux n'étant pas obligatoire, il est donc difficile de quantifier l'exposition de la population générale. Par ailleurs, l'essor des nanomatériaux dans les produits cosmétiques pose la question de leur distribution dans l'organisme *via* la voie respiratoire, orale ou

cutanée. A titre d'exemple, l'exposition à certains nanomatériaux en suspension de diamètre moyen de 90 nm aboutit à une dose interne de 30-40 % alors que cette dernière est de 70-80 % pour des nanomatériaux de diamètre moyen de 20 nm (SCENIHR, 2009). L'une des questions majeures soulevées concernent la distribution et l'accumulation. En effet, la capacité de certains nanomatériaux à s'accumuler dans des organes tels que le foie, le rein, la rate, le cerveau ou les ganglions constituant ainsi des organes dits « sentinelles » à la distribution/accumulation des nanomatériaux dans l'organisme. Ainsi, la toxicocinétique constitue une donnée préalablement nécessaire dans la caractérisation du danger des nanomatériaux.

Par ailleurs, certains nanomatériaux, en raison de leur faible dimension et de leur activité de surface, seraient capables de pénétrer dans les cellules pour finalement atteindre le noyau et potentiellement endommager l'ADN. D'où la nécessité d'évaluer le potentiel génotoxique des nanomatériaux, prédictif du pouvoir cancérogène.

Le présent rapport est divisé en deux parties. La première partie concerne les nanomatériaux dans les produits cosmétiques. La saisine de la DGS portant sur les connaissances actuelles relatives à la pénétration cutanée, la génotoxicité et la cancérogenèse du TiO_2 et du ZnO à l'échelle nanoparticulaire ; la deuxième partie s'attache à présenter les données disponibles concernant ces deux types de nanomatériaux.

Partie 2 : Etudes relatives aux nanoparticules de TiO₂ et de ZnO dans le domaine cosmétique

Comme exposé précédemment, le présent rapport traite des connaissances actuelles relatives à la pénétration cutanée, la génotoxicité et la cancérogenèse du TiO₂ et du ZnO à l'échelle nanoparticulaire.

1. Généralités sur le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc

Les filtres ultraviolets (UV) des produits de protection solaire peuvent être divisés en deux catégories : organiques et inorganiques. La catégorie des filtres UV inorganiques est représentée par le TiO₂ et le ZnO.

L'application majeure du TiO₂ et du ZnO dans le domaine de la cosmétique concerne leur utilisation en tant que filtres UV. Ces deux composés, que ce soit sous la forme nano- ou microcristalline, constituent une barrière efficace contre les rayons UVA et UVB du soleil. Les UVB sont responsables des brûlures de la peau (ou « coups de soleil »), mais également d'autres pathologies tels que les cancers cutanés.

A titre d'exemple, l'Australie est l'un des pays utilisant fortement les produits de protection solaire en raison de la forte prévalence de cancers cutanés due à l'exposition aux rayonnements UVA et UVB.

Le TiO₂ et le ZnO sont actuellement principalement utilisés sous forme nanoparticulaire dans les produits de protection solaire. Ainsi, sur la base des données fournies par l'Autorité compétente australienne en matière de santé (Therapeutic Goods Administration ou TGA), le Gouvernement australien a estimé en 2006 que 70 % du TiO₂ et 30 % du ZnO utilisés dans les produits de protection solaire, étaient sous forme nanoparticulaire (TGA, 2006).

Les formulations contenant des filtres de taille conventionnelle sont difficiles à appliquer sur la peau et entraînent un aspect peu esthétique en raison de la pigmentation blanche visible sur la peau. En effet, la réduction à l'échelle nanométrique de ces nanomatériaux présente deux avantages principaux car elle permet l'amélioration du spectre d'absorption de ces deux filtres UV d'une part et d'obtenir la transparence des produits de protection solaire d'autre part. Il est à noter que la taille nanométrique des NPs de TiO₂, inférieure à 30 nm, est nécessaire pour que le produit de protection solaire soit transparent et présente une meilleure efficacité d'absorption des rayonnements UV (Afsset, 2010).

Le TiO₂ figure à l'annexe VII de la directive cosmétique 76/768/CEE, c'est-à-dire sur la liste des filtres UV que peuvent contenir les produits cosmétiques, avec une restriction d'utilisation à un maximum de 25 %. Une évaluation du risque sanitaire du TiO₂ micrométrique a été réalisée en 2000 (SCCNFP, 2000) cependant, même si des données limitées relatives à la forme nanoparticulaire sont décrites dans l'avis du CSSC (SCCP, 2007), sa forme nanoparticulaire n'a à ce jour pas fait l'objet d'une évaluation des risques sanitaires finalisée. Or, il est généralement admis que les nanomatériaux peuvent présenter différentes propriétés chimiques, optiques, magnétiques et structurales et par conséquent la forme nanoparticulaire peut présenter des différences de profil toxicologique par rapport à celui de la forme micrométrique.

Ainsi, à la lumière des données disponibles relatives au danger, le CSSC a été saisi en 2007 par la Commission européenne pour reconsidérer, si nécessaire, les évaluations précédentes (SCCP, 2007). Contrairement aux avis initiaux, le CSSC a conclu que dans le cas des nanomatériaux, le calcul de la marge de sécurité conventionnelle n'est probablement pas approprié pour l'expression de la sécurité de ces nanomatériaux. En ce qui concerne le TiO₂, dont l'utilisation a été soutenue par l'Industrie cosmétique européenne, de nouvelles données sont attendues afin de :

- (i) procéder à son évaluation notamment chez une population présentant des peaux anormales et,
- (ii) comprendre l'impact des effets mécaniques sur la pénétration cutanée⁶.

Par ailleurs, le CSSC a rendu récemment un avis favorable (SCCP, 2009) à la forme non-nano, du ZnO (taille des particules supérieure à 100 nm). Ceci exclut donc la forme nanométrique du ZnO en tant que filtre UV. Il est à noter que le ZnO ne figure pas sur la liste des filtres UV que peuvent contenir les produits cosmétiques de la Directive cosmétique 76/768/CEE.

⁶ Afssaps (2010). Cahier d'acteurs : L'Afssaps et les nanotechnologies. En ligne : http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/085a0573b7b333052f9edf06e20f5236.pdf

2. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc dans les produits cosmétiques

Le TiO_2 existe sous trois formes cristallines : anatase, rutile et brookite. Les propriétés d'absorption des rayons UV ne sont effectives qu'avec les formes anatase et rutile étant donné leur capacité d'absorption pour une longueur d'onde située aux alentours de 400 nm (Buchalska *et al.*, 2010). Outre leur utilisation dans l'industrie cosmétique en tant que filtre UV, les formes anatase et rutile du TiO_2 sont utilisées dans d'autres industries en tant que nettoyant et/ou désinfectant de certaines surfaces en raison de leurs propriétés photocatalytiques.

Toutefois, ces propriétés photocatalytiques ne sont pas recherchées et sont plutôt à éviter dans les produits de protection solaire car générant des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent léser l'ADN mais également endommager d'autres molécules biologiques telles que les lipides insaturés, les protéines, et conduire à des phénomènes de cytotoxicité, d'apoptose et de nécrose. La forme anatase possédant des propriétés photocatalytiques supérieures à celles présentées par la forme rutile (Buchalska *et al.*, 2010), l'industrie cosmétique s'attache à utiliser principalement la forme rutile du TiO_2 ou des mélanges d'anatase/rutile. En outre, les NPs peuvent être dopées par du manganèse par exemple ou enrobées d'alumine, de silice mais aussi de substances organiques telles que la cyclométhicone, diméthicone, l'acide stéarique, etc. afin de diminuer ces effets photocatalytiques d'une part, mais également d'améliorer l'incorporation des particules de TiO_2 dans les formulations (SCCNFP, 2000). L'enrobage permet de diminuer la libération des ERO à la différence du dopage au manganèse qui semble diminuer la production d'ERO au cœur des NPs.

Concernant le ZnO , il existe sous trois formes cristallographiques : la forme cubique (Rocksalt), la forme blende, et la forme hexagonale (Wurtzite). La forme la plus stable thermodynamiquement est la structure hexagonale compacte, zincite, avec une structure de type Wurtzite. Son aptitude à réfléchir la lumière UV fait du ZnO un candidat de choix pour son utilisation en tant que filtre UV dans les produits de protection solaire.

Le site Internet américain « *Skin Deep Cosmetic Safety database* » répertorie 234 produits cosmétiques contenant des NPs de ZnO et 521 produits cosmétiques contenant des NPs de TiO_2 . Les produits de protection solaire peuvent contenir des NPs de TiO_2 ou de ZnO seules mais également en mélange.

Comme il l'a été précisé dans le précédent paragraphe, le TiO_2 en tant que filtre UV peut être utilisé jusqu'à une concentration maximale de 25 % dans le produit fini. En ce qui concerne le ZnO , d'après le site *Skin Deep Cosmetic Safety database*, le niveau de concentrations se situe généralement à 6 % en moyenne mais l'on peut rencontrer des produits contenant jusqu'à 18,5 % de NPs de ZnO . Il est important de noter que cette base de données est américaine et que le nombre de produits est susceptible de varier.

Concernant la taille des NPs de TiO_2 utilisées dans les produits cosmétiques, elle est comprise entre 15 et 30 nm en moyenne. Toutefois la taille des NPs de ZnO n'est pas précisée exactement, elle se situe néanmoins dans une gamme inférieure à 100 nm.

Il est à noter que les particules de TiO_2 et de ZnO peuvent former des agrégats et des agglomérats, réduisant leurs effets photocatalytiques (Tran *et al.*, 2010).

3. Rôle des propriétés physico-chimiques

Les données de la littérature sont abondantes pour les NPs de TiO_2 au regard de leur utilisation dans de nombreux domaines, autres que celui de la cosmétologie. Récemment, l'agence de protection environnementale américaine (U.S. EPA) a publié une revue concernant les NPs de TiO_2 utilisées pour le traitement de l'eau d'une part et en tant que filtre UV dans les produits de protection solaire d'autre part (U.S. EPA, 2009 revue disponible en ligne en 2010). Cette revue fait état notamment du rôle des propriétés physico-chimiques des NPs de TiO_2 dans les produits de protection solaire et donc dans les produits cosmétiques. Ainsi, les données issues de cette revue sont présentées dans le présent rapport. Il est à noter que les données exposées dans ce paragraphe concernent les NPs de TiO_2 mais certaines peuvent être applicables aux NPs de ZnO .

3.1. Taille des nanoparticules de dioxyde de titane

La taille des NPs de TiO_2 (taille primaire des particules et taille des agrégats et agglomérats de particule dans la formulation finale) détermine le degré de protection vis-à-vis des rayons UVA et

UVB, l'opacité de la formulation mais également la stabilité de la dispersion des particules dans la formulation. Il est important de noter que l'on parle de taille primaire des nanoparticules lorsqu'elles ne sont pas incorporées dans les formulations cosmétiques. En effet, les NPs de TiO_2 peuvent s'agréger ou s'agglomérer une fois incorporées aux autres substances de la formulation, pour former des agrégats et agglomérats dont la taille est supérieure à la taille primaire des NPs.

La revue de l'U.S. EPA (2009) précise après analyse des données de la littérature, que la taille des particules permettant une protection vis-à-vis des rayons UVA comme des rayons UVB se situe aux alentours de 50 nm. Néanmoins, Chaudhuri et Majewski (1998) notent que l'utilisation de NPs de TiO_2 d'une taille primaire de 10-20 nm et une taille des agrégats/agglomérats de 100 nm dans la formule finale, permet d'obtenir une formulation efficace pour se protéger du rayonnement UV. Pour rappel, l'Afsset (2010) précise que la taille primaire des NPs de TiO_2 , inférieure à 30 nm, est nécessaire pour que le produit de protection solaire soit transparent et présente une meilleure efficacité d'absorption des rayonnements UV.

La taille des particules détermine également le degré d'opacité des formulations à base de particules de TiO_2 . Ainsi, les particules de grande taille transmettent moins la lumière dans le domaine du visible à la différence de particules de petite taille. Par ailleurs, l'aggrégation des particules peut aboutir à des formulations plus opaques. Ainsi, la revue de l'U.S. EPA (2009) spécifie que des particules dont la taille est supérieure à 200 nm dans les produits de protection solaire ou dans les produits cosmétiques en général, laissent sur la peau après application un film de couleur blanche considéré comme peu esthétique ; alors que, des formulations contenant des agglomérats de particules de TiO_2 d'une taille de 100-120 nm (taille primaire des particules 10 nm) ou 120-125 nm (taille primaire des particules 15 nm) seraient presque transparentes après application topique.

Enfin, Chaudhuri et Majewski (1998) notent que la taille des particules peut également affecter la stabilité de la dispersion de la formulation. Ainsi, l'hypothèse avancée serait que les petites particules permettent une meilleure dispersion en raison de leur large surface d'où une plus grande viscosité.

3.2. Photostabilité et enrobage/dopage

Les NPs de TiO_2 sont des semi-conducteurs naturels comportant des propriétés photocatalytiques. La photocatalyse repose sur la capacité du semi-conducteur à stabiliser les porteurs de charges photogénérés pour qu'ils puissent réagir à la surface en réduisant ou en oxydant les espèces environnantes. Ainsi, la photocatalyse est utilisée pour réduire de l'eau en hydrogène, ou pour oxyder des espèces polluantes présentes dans l'eau, l'air ou encore à la surface de systèmes autonettoyants (Gohin, 2009). Néanmoins ces propriétés photocatalytiques ne sont pas recherchées dans les produits cosmétiques car génératrices d'espèces réactives de l'oxygène susceptibles d'endommager les cellules de la peau et de réagir avec les autres constituants de la formulation. Les mécanismes et conséquences cellulaires de la photocatalyse sont traités dans le paragraphe 5.

Le choix de la taille et de la forme cristalline des particules de TiO_2 affecte la photostabilité. Ainsi, l'étude de Jiang *et al.* (2008) présentée dans le paragraphe 5.2., détaille les paramètres influençant la photostabilité. Ainsi, la forme cristalline anatase semble plus photoréactive que la forme cristalline rutile.

Afin d'augmenter la photostabilité (ou de réduire la probabilité que les molécules excitées libèrent des électrons), les NPs de TiO_2 sont enrobées. Par exemple, un enrobage de particules de TiO_2 composé de dioxyde de silicium et d'alumine (3,5 % par masse) peut réduire l'activité photocatalytique de 99 % (SCCNFP, 2000).

Une autre technique utilisée pour augmenter la photostabilité des NPs de TiO_2 consiste en l'incorporation de métaux tels que le manganèse, le vanadium, le chrome ou le fer. Cette technique est appelée « dopage ». A titre d'exemple, le dopage de NPs de TiO_2 par du manganèse augmenterait l'absorption des rayons UVA, réduirait la génération de radicaux libres et augmenterait l'activité des systèmes antioxydants (US EPA, 2009).

3.3. Dispersion et pH

Les NPs de TiO_2 peuvent exister sous forme de poudre mais de nombreuses applications dans les produits cosmétiques nécessitent que les particules soient suspendues dans un milieu liquide. Ce fluide est appelé « milieu de dispersion » et permet d'obtenir une bonne répartition des particules dans la formulation et de minimiser l'aggrégation et l'agglomération. Les industries cosmétiques peuvent réaliser leur propre dispersion ou peuvent acheter aux fournisseurs de matières premières des NPs de TiO_2 déjà dispersées et « prêtes à l'emploi ».

Le milieu de dispersion peut être aqueux, huileux ou à base de silicone. Les enrobages qui permettent aux NPs de TiO_2 de se disperser dans des milieux non-aqueux peuvent être lipophiles (lécithine par exemple), hydrophobes (méthicone par exemple) ou les deux.

En ce qui concerne la dispersion des NPs de TiO_2 dans un milieu liquide, deux points importants sont à discuter : le pH au point zéro (ppz) qui correspond au point pour lequel la densité en charge de surface est égale à zéro ; et le point isoélectrique (PIE), qui correspond au pH pour lequel la charge électrique de surface nette des particules est égale à zéro. Pour la plupart des valeurs de pH, les NPs de TiO_2 suspendues dans un milieu de dispersion possèdent une charge positive ou négative et se repoussent les unes par rapport aux autres. Toutefois si le pH est égal au PIE, il n'existe pas de répulsion électrostatique et les particules tendent à s'agglomérer. Ainsi, il est nécessaire de maintenir le pH du milieu de dispersion à une valeur autre que celle du PIE à chaque étape de production et au moment du stockage. Enfin il est à noter que les enrobages peuvent modifier le pH.

3.4. Autres paramètres

Les filtres inorganiques tels que les NPs de TiO_2 et de ZnO peuvent être combinés avec des filtres organiques ou chimiques dans certaines formulations de produits de protection solaire. Cette combinaison de filtres UV permet d'obtenir des formulations très efficaces contre les rayons UVB.

En outre, il est possible de combiner des NPs TiO_2 et de ZnO dans une même formulation mais celles-ci ont tendance à s'agglomérer. Ainsi, il est préférable d'incorporer un type de NPs dans la phase huileuse de l'émulsion et l'autre dans la phase aqueuse.

D'autres paramètres tels que la présence de substances émoullientes ou l'ajout de substances inertes sont détaillées dans la revue de l'U.S. EPA (2009).

3.5. Résumé des caractéristiques physico-chimiques

Les NPs de TiO_2 et de ZnO commercialisées diffèrent en fonction de la taille des particules, de la surface, de la pureté, de la forme cristalline, etc.

A titre d'exemple, les caractéristiques suivantes peuvent différer d'une nanoparticule à l'autre :

- agglomération/agrégation dans le milieu de dispersion ;
- composition des enrobages/dopages ;
- structure cristalline ;
- coefficient de partition octanol-eau ;
- taille et distribution des particules ;
- activité photocatalytique (NPs de TiO_2) ;
- porosité ;
- pureté de l'échantillon ;
- aspect (forme, longueur, largeur) ;
- surface spécifique ;
- charge de surface ;
- surface d'activité.

Considérant l'utilisation des nanomatériaux de TiO_2 et de ZnO dans les produits cosmétiques et en particulier dans les produits de protection solaire, produits d'application topique, la question d'une possible absorption cutanée engendrant leur biodisponibilité et distribution dans les organes cible, se pose fortement. Ainsi, une revue de la littérature relative aux études de pénétration cutanée a été réalisée dans le présent rapport. Etant donné le rôle majeur des propriétés physico-chimiques des NPs dans leur activité, il est difficile de généraliser les résultats aux NPs de TiO_2 et de ZnO et donc une interprétation des résultats au cas par cas est indispensable.

4. Etudes d'absorption cutanée

Pour rappel, des généralités sur la structure cutanée sont présentées en annexe 2.

4.1. Données *in vitro*

4.1.1. Modèle de peau animale

Bien qu'il soit difficile d'extrapoler les données d'absorption cutanée du modèle animal à l'homme, quelques études *in vitro* d'absorption cutanée sur le TiO₂ et le ZnO ont été effectuées sur peaux animales.

Ainsi, Pflücker *et al.* (1999), réalisent une étude d'absorption cutanée *in vitro* de particules de TiO₂ avec des cellules de Franz, sur peau de porc excisée. L'analyse des particules de TiO₂ est ensuite effectuée par microscopie électronique à transmission (MET) : elle a permis de mettre en évidence des agglomérats de particules mais également des particules isolées caractérisées par une forme cubique et une taille comprise entre 20 et 50 nm. Une méthode de « *tape-stripping* »⁷ associée à une lecture par microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée afin de déterminer la distribution des particules de TiO₂ au sein de la couche cornée. Les résultats montrent que les particules de TiO₂ restent exclusivement dans les parties les plus externes de la couche cornée. Au niveau des résultats de l'absorption *via* le follicule pileux, les particules de TiO₂ ont seulement été détectées sur la partie haute du follicule pileux et non dans l'épithélium de ce dernier.

Les auteurs concluent à une persistance des particules de TiO₂ au niveau des couches les plus externes de la couche cornée et à une absence de passage de ces mêmes particules à travers le follicule pileux.

Une autre étude sur peau de porc a été effectuée par Gamer *et al.* (2006) mettant en jeu des NPs de TiO₂ et de ZnO. Cette étude concerne l'analyse de l'absorption cutanée de deux types de TiO₂, T-Lite SF-S (traité par de la silice 2-5 %, aiguilles de taille 30-60 nm X 10 nm, agrégats en solution 200 nm et 1 µm) et T-Lite SF (traité par de la méthicone 3,5-5,5 %, aiguilles de taille 30-60 nm X 10 nm, agrégats en solution 200 nm et 1 µm), et d'un type de ZnO non traité, le Z-Cote (CAS 1314-13-2, sphérique, 80 nm). Les auteurs indiquent avoir suivi la méthode décrite par la ligne directrice OCDE 428 ainsi que les recommandations OCDE N°28. L'analyse des résultats montrent la présence de NPs de TiO₂ et de ZnO dans le *stratum corneum*. Toutefois, aucune information concernant une éventuelle absorption cutanée *via* les follicules pileux, n'est donnée dans cette étude.

Lekki *et al.* (2007) s'intéressent dans leur étude au passage percutané de NPs de TiO₂ à travers les follicules pileux. Les formulations utilisées contiennent des NPs enrobées de TiO₂ d'une taille de 20 nm et avec une longueur de 100 nm, présentes à une concentration de 5 % dans une formulation de gel. Une partie de l'étude se déroule sur peau de porc et l'autre partie sur peau humaine, les résultats étant similaires sur les deux modèles. Différents temps de contact ont été étudiés allant de 30 minutes à 48 heures et la détection a été effectuée en utilisant la méthode PIXE (*Particle induced X-ray emission*). Les résultats montrent une présence de NPs de TiO₂ au niveau des couches les plus externes du *stratum corneum*, ce qui confirme les résultats des précédentes études. Ces NPs de TiO₂ sont également retrouvées au niveau du follicule pileux à une profondeur de 100 µm, voire jusqu'à 400 µm. Toutefois, les auteurs précisent que certains follicules pileux sont exempts de NPs de TiO₂ et émettent l'hypothèse que ces résultats puissent provenir d'un manque d'homogénéité de la formulation et qu'ainsi, certains follicules pileux ne sont pas exposés aux NPs de TiO₂. Les auteurs n'ayant pas observé de NPs de TiO₂ au niveau des tissus environnant les follicules pileux, ces derniers ne concluent pas à un passage percutané *via* les follicules pileux vers la circulation systémique et avancent l'hypothèse selon laquelle le relargage de ces NPs est dû à la production de sébum et/ou la croissance du poil.

Comme il l'a été dit précédemment, les études issues de la littérature scientifique s'intéressent principalement aux NPs de TiO₂. Cependant, l'étude suivante (Kuo *et al.*, 2009) traite de l'absorption cutanée de NPs de ZnO et en particulier, les auteurs de cette publication se sont intéressés au rôle facilitateur que pourraient avoir certains excipients sur l'absorption de ces particules, en particulier l'acide oléique (AO), l'éthanol et l'association de ces deux derniers. En effet, en modifiant la structure de la bicouche lipidique ou en augmentant la solubilité d'une substance dans son véhicule, ces deux excipients communément utilisés dans les produits cosmétiques peuvent favoriser l'absorption cutanée. Des NPs de ZnO d'une taille de 10 nm sont préparées à 10 % soit dans une solution de PBS

⁷ Méthode de « *tape stripping* » : méthode non invasive de prélèvement de la couche cornée à l'aide d'adhésifs.

(Phosphate buffer saline), soit dans une solution à 5 % AO-PBS, soit dans une solution à 45 % éthanol-PBS, soit dans une solution à 5 % AO, 45 % éthanol-PBS. Les échantillons de peau de souris nude (BALB/cAnN.Cg-Foxnlhu/CrI Narl), sont montées sur cellules de Franz. Le produit à tester est appliqué pendant 12 h. Quatre sites par échantillon sont observés au microscope. L'intensité des signaux correspondant aux NPs de ZnO augmente d'autant plus qu'elles sont appliquées avec l'AO, l'éthanol et le mélange (dans cet ordre). Cette augmentation est mesurée dans les 30 μm superficiels du *stratum corneum*, et s'atténue dans les régions plus profondes. Ainsi, cette étude *in vitro* montre le rôle favorisant de certains excipients dans l'absorption cutanée des NPs de ZnO. Les NPs de ZnO restent localisées dans les couches externes de la peau.

L'étude récente de Wu *et al.* (2009) sur NPs de TiO_2 comporte une partie *in vitro*. Les NPs de TiO_2 utilisées sont soit de l'anatase (de 4 et 10 nm), soit du rutile (de 25, 60 et 90 nm), soit la forme mixte de Degussa P25 (mélange anatase/rutile, taille 21 nm), sans modification de surface. Dans la partie expérimentale *in vitro*, les particules de 4, 10, 25, 60 et 90 nm sont mises en suspension à 5 % dans une solution à 20 % LCC (triglycérides caprylique et caprique). Les échantillons de peau porcine sont prélevés sur l'oreille, préparés en peau entière (épiderme et derme), et montés sur cellule de diffusion statique. L'application dure 24h, sur une zone de 0,78 cm^2 . Le liquide récepteur (PBS) est prélevé à cinq périodes de temps (3, 6, 9, 12 et 24 heures) après l'application. Une biopsie est prélevée pour l'analyse par MET et par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et 30 « strips » sont appliqués sur l'échantillon. Le TiO_2 est dosé par spectrométrie d'absorption atomique à flamme (limite de détection 20 $\mu\text{g/l}$).

Les NPs de TiO_2 ne sont pas détectées dans les « strips », regroupés par 5. L'analyse par MET confirme de faibles quantités dans les couches supérieures de la peau, et l'absence de particules dans les couches plus profondes de l'épiderme et du derme.

Enfin, récemment Senzui *et al.* (2010), ont étudié *in vitro* la pénétration cutanée des NPs de TiO_2 sur peau de porc saine et lésée. Tous les types de NPs de TiO_2 utilisés correspondent à la forme rutile : T-35 non enrobées (35 nm) ; TC-35 (35 nm) enrobées d'alumine, de silice et de silicone ; T-disp (10*100 nm) enrobées d'alumine et de silice ; T-250 (250 nm) non enrobées. Des quantités de 2 $\mu\text{l/cm}^2$ ont été appliquées sur la peau de porc saine et après 24 heures d'exposition, les auteurs ont procédé à l'analyse de la pénétration cutanée (par MEB-EDX). Les concentrations en TiO_2 sont mesurées par ICP-MS (« Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy »). Les résultats montrent une absence de pénétration au niveau du derme et de l'épiderme viable, les particules étant détectées dans le *stratum corneum*.

4.1.2. Modèle de peau humaine

L'étude de Mavon *et al.* (2007) porte sur des volontaires mais n'étudie pas le devenir des NPs de TiO_2 dans les follicules pilosébacés. Cette étude comporte deux parties, une partie *in vivo* sur trois volontaires et l'autre *in vitro* sur peau de donneurs. Une formulation contenant deux filtres UV, un filtre chimique le méthylène bis-benzotriazolyl tétraméthylbutyl phénol (MBBT) (8 %) et des NPs de TiO_2 (3 %) dont la taille correspond à 20 nm est utilisée. Une dose de 2 mg/cm^2 sur une surface de 10 cm^2 a été appliquée (temps de contact : 5 heures) dans les deux études, *in vitro* et *in vivo*. Une méthode de « tape-stripping » a été utilisée et la détection des NPs de TiO_2 a été réalisée par une méthode colorimétrique, MET et micro-PIXE. Les résultats montrent une accumulation des NPs de TiO_2 dans les couches supérieures du *stratum corneum*.

Par ailleurs, l'étude de Van der Merwe *et al.* (2009) montre la présence de NPs de TiO_2 dans les couches supérieures de la peau *in vitro*. Ainsi, l'absorption d'un mélange d'oxyde de magnésium et de TiO_2 sous forme nanoparticulaire est étudiée sur peau humaine, à partir de la poudre, d'une suspension aqueuse et d'une suspension contenant du sulfate de lauryle sodium (SLS), pendant 8 heures. Les particules d'oxyde de magnésium (MgO) et de TiO_2 ont une surface spécifique de 300 m^2/g , une porosité de 0,3 cm^3/g et forment des agrégats de 4,8 μm . Les particules de MgO ont des dimensions de 7 nm sur 100 ou 200 nm, alors que les particules de TiO_2 ont une taille inférieure à 1 nm (d'autres caractéristiques sont décrites dans la publication). Des cellules de diffusion sont utilisées pour l'expérience. Sur les échantillons de peau et pendant 8 heures, 50 mg de poudre/ cm^2 sont appliqués et la même quantité est également utilisée sous forme de suspension dans 500 μl d'eau, ou encore dans une suspension contenant 500 μl d'eau et du SLS (1 mg). Le TiO_2 et MgO sont analysés dans le liquide récepteur, après prélèvement chaque heure, par spectrométrie de masse. Une partie des échantillons est étudiée par MET. Aucun passage de MgO ou de TiO_2 n'est détecté dans le liquide récepteur. Le choix du type de cellule de diffusion (dynamique) est très discutable : les éventuelles quantités absorbées risquent d'être diluées avec ce système. Une cellule statique aurait

permis de les concentrer. En MET, les nanoparticules de TiO_2 et MgO sont observées en surface et dans les couches supérieures, parmi les cornéocytes desquamants.

Concernant la pénétration cutanée *in vitro* des NPs de ZnO sur peau humaine, deux études ont été réalisées : elles montrent comme dans les études sur modèle animal, une présence de ces NPs au niveau des couches supérieures de la peau. Ainsi, Cross *et al.*, (2007) effectuent une étude portant sur trois formulations de produit de protection solaire contenant des NPs de ZnO : une dispersion à 60 % de ZnO dans un dérivé synthétique des huiles : capric/caprylic triglycérides ou Mygliol® (ZinClear-S_60CCT), une émulsion L/H contenant 20 % de ZnO (en utilisant le ZinClear_40CCT) et une émulsion blanche sans ZnO . Les particules de ZnO , de forme sphérique et d'une taille comprise entre 25 à 30 nm (caractérisation de la taille par MET, mesure de la surface spécifique par « Brunauer-emmett-teller nitrogen-gas absorption method » (BET), diffraction aux rayons X (XRD) ou « Photon correlation spectroscopy » (PCS) sont enrobées de polyméthylsilésquioxane. L'observation histologique après 24 heures de contact a permis de mettre en évidence la présence de NPs de ZnO dans les couches les plus externes du *stratum corneum*, aucune NP de ZnO n'a été détectée au niveau des couches plus profondes de ce dernier. Les auteurs concluent à une pénétration cutanée négligeable des NPs de ZnO .

Par ailleurs, Zvyvagin *et al.* (2008) montrent des résultats similaires. Le produit étudié comporte 19 % de ZnO , sous forme de particules de 26 à 30 nm. Dans sa partie *in vitro* (voir aussi *in vivo*), l'expérience est effectuée sur des peaux humaines de la poitrine ou de l'abdomen. Une quantité non définie de produit est déposée sur la peau pendant 2 ou 24 h, puis la peau est « strippée » 15 à 20 fois, et des échantillons fixés sont préparés pour l'observation microscopique. Celle-ci ne révèle pas d'absorption des NPs, après 2 heures d'exposition, mais montre leur localisation préférentielle autour de l'orifice de follicules pileux, ainsi que dans cette structure. Les agrégats de ZnO sont localisés dans la partie du follicule pileux située dans le *stratum corneum (infundibulum)* ; ils n'atteignent pas les profondeurs de l'épiderme.

Une troisième étude récente (Szikszai *et al.*, 2010) concerne la pénétration cutanée des NPs de ZnO sur peaux humaines obtenues après ablation chirurgicale (3 patients). Deux études sont réalisées : l'une sur peau humaine intacte et l'autre sur peau humaine « strippée », mimant une peau lésée. Ainsi, les peaux sont traitées par une émulsion hydrophobique contenant 20 % de NPs de ZnO enrobées (Z-COTE® Max : ZnO enrobé de diméthoxydiphénylsilane/triéthoxycaprylsilane) durant 48 heures sous occlusion. Il est à noter que la taille des particules n'est pas précisée, toutefois les auteurs précisent que l'émulsion utilisée garantit une taille inférieure à 200 nm. Par ailleurs, les auteurs soulignent également que la taille des particules de ZnO non enrobées de cette émulsion se situe aux alentours de 80 nm mais celle des particules enrobées n'est pas précisée. Les méthodes PIXE et STIM (« Scanning Transmission Ion Microscopy ») sont utilisées pour détecter les particules. Les résultats de cette étude sur six sites de peau intacte provenant de trois patients montrent une forte présence en particules au niveau du *stratum corneum*.

4.1.3. Conclusions sur l'absorption cutanée *in vitro*

Les résultats de ces études *in vitro* de pénétration cutanée sur modèle animal ou humain, tendent à montrer que les NPs de TiO_2 et de ZnO persistent dans les couches supérieures de la peau *in vitro*. Toutefois de nombreuses études n'utilisent pas de protocoles standardisés et validés comme peuvent le recommander le CSSC et l'OCDE. On notera notamment que les peaux excisées ne peuvent être utilisées que quelques dizaines d'heures, leur intégrité étant par la suite altérée. Par ailleurs, il n'existe pas de protocoles comparables, reproductibles et répétables pour caractériser et détecter les NPs. De plus, au niveau du follicule pileux, il semblerait qu'une présence des NPs soit possible (Lekki *et al.* 2007) toutefois ces dernières ne semblent pas passer au niveau systémique mais s'accumulent préférentiellement dans l'*infundibulum* pilo-sébacé.

La réalisation d'études *in vivo* s'avère nécessaire pour confirmer les résultats retrouvés *in vitro* et les parties suivantes s'attacheront à discuter les résultats de ces études *in vivo*.

4.2. Données *in vivo*

4.2.1. Animal

Les études d'absorption cutanée *in vivo* sont rares actuellement, seules trois études ont été réalisées à notre connaissance, celle de Menzel *et al.* (2004) sur porc, celle de Wu *et al.* (2009) sur souris et celle de Sadrieh *et al.* (2010) sur mini-porcs. Il est à noter que l'étude de Menzel *et al.* (2004)

est réalisée sur des temps d'exposition courts (maximum 48 heures) par rapport aux deux autres études.

Les travaux de Sadrieh *et al.* (2010) constitue une étude clé concernant l'évaluation de la pénétration cutanée du TiO_2 en raison des temps d'exposition et de l'espèce utilisée qui en termes de perméabilité, d'épaisseur épidermique, de physiologie et de densité pileuse reste la plus proche de l'homme.

L'étude de Menzel *et al.* (2004) met en jeu l'analyse de l'absorption cutanée sur peau de porc congelée de quatre formulations : la crème commerciale EUCERIN® contenant 5 % de TiO_2 , la dispersion liposomale avec 18 % de TiO_2 (qualité Tioveil AQ-N, Water-based titanium dioxide dispersion), la formulation SG1101 avec 4.5 % de TiO_2 (qualité Tioveil AQ-N) et la prédispersion aqueuse de titane à 40 % (Tioveil AQ-N). Trois méthodes de détection des particules sont utilisées : PIXE, la spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford (*Rutherford backscattering spectrometry* ou RBS) et STIM. Les particules analysées sont de forme allongée avec une longueur comprise entre 45 et 150 nm et une largeur comprise entre 17 et 35 nm.

La peau du dos des porcs a été lavée, rasée et désinfectée avec de l'alcool puis les différentes formulations ont été appliquées sur une zone de 1 cm^2 sous occlusion. Les porcs ont été euthanasiés et des biopsies de peau ont été prélevées puis congelées pour analyse.

L'étude est effectuée avec des temps d'exposition de 8, 24 et 48 heures. Les résultats ont montré la présence de fortes concentrations de particules de TiO_2 dans le *stratum corneum*, mais également en plus faibles quantités dans le *stratum granulosum*.

Wu *et al.* (2009) ont réalisé la première étude d'exploration de l'absorption cutanée des NPs *in vivo*, chez l'animal sur un temps d'exposition supérieur à 48 heures. Cette étude comporte une partie *in vivo*, réalisée chez la souris imberbe (« *hairless* ») et le porc.

Les NPs de TiO_2 utilisées sont soit sous forme cristalline anatase (de 4 et 10 nm), soit sous forme cristalline rutile (de 25, 60 et 90 nm), soit sous forme mixte de Degussa P25 (21 nm), sans modification de surface.

Dans la partie expérimentale *in vivo*, les particules de 4, 10, 25, 60 et 90 nm sont mises en suspension à 5 % dans un gel de carbomère (Carbopol 940) à 2 %.

Des porcs de 3 semaines au début de l'expérience sont utilisés afin d'étudier la fonction de barrière cutanée. Une quantité de 24 mg de la formulation (particules de 4 ou 60 nm) est appliquée sur l'oreille rasée, sur une surface de 3 cm^2 , pendant 30 jours (répétition de l'application non précisée, occlusion non précisée). A la fin de la période d'application, une biopsie est prélevée pour observation en MET.

Des souris BALB/c imberbes, âgées d'environ 7 semaines, sont utilisées pour l'étude de la distribution tissulaire des particules. 6 groupes de 6 animaux sont constitués, pour 5 conditions de traitement et un contrôle. Les groupes d'animaux traités reçoivent des particules de 10, 25 (et P25) ou 60 nm, ou de taille qualifiée de « normale » (90 nm), dans la formulation à 5 %, de façon répétée quotidiennement. La zone d'exposition est d'environ 3 cm^2 , l'application est donc de 8 mg de produit par cm^2 , ou $400 \mu\text{g}$ de TiO_2/cm^2 .

Cette zone est protégée 3 heures quotidiennement par un collier non occlusif et 24 heures après la dernière application, les animaux sont sacrifiés. Le sang veineux, la peau, les muscles, le foie, le cœur, la rate, les reins, le cerveau et les poumons sont prélevés.

Chez les souris, la distribution des particules est similaire chez les mâles et les femelles. Les particules de TiO_2 sont détectées dans la peau, les muscles, le foie, le cœur, les poumons et la rate. Les auteurs considèrent comme négligeable la présence de particules dans le cerveau (les particules de TiO_2 P25 sont en plus grand nombre dans le cerveau) et le rein. Elles ne circulent pas dans le compartiment sanguin.

Après application pendant 30 jours sur l'oreille de porc, l'analyse en MET montre que les particules franchissent le *stratum corneum*, le *stratum granulosum*, le *stratum spinosum* et la couche de cellules basales mais n'atteignent pas le derme. La pénétration des particules dépend de leur taille (celles de 4 nm atteignent les couches les plus profondes, celles de la membrane basale).

Cette étude, menée pendant des temps d'exposition longs et investiguant la localisation et les effets des NPs de TiO_2 montre, chez le porc exposé pendant 30 jours, une absorption limitée dans la peau, dépendante de la taille des particules. Toutefois, aucune particule testée dans cette étude n'atteint le derme. Chez la souris exposée pendant 60 jours, les particules sont retrouvées dans certains organes, mais absentes du compartiment sanguin.

Une lettre à l'éditeur a été envoyée par Jonaitis *et al.* (2010) fait état d'une analyse critique de l'étude de Wu *et al.* (2009). Il y est indiqué que bien que Wu *et al.* (2009) précisent que les préparations utilisées soient stables et homogènes, aucune donnée n'est apportée pour confirmer cette stabilité et

homogénéité. Ensuite, Wu *et al.* (2009) ne rapportent pas précisément les conditions dans lesquelles les animaux ont été traités : cages individuelles ou collectives ? De même, les sites d'application ne sont pas recouverts de façon appropriée, ce qui suggère une possible contamination des groupes d'animaux contrôle par les groupes d'animaux traités, par frottement de peau contre peau par exemple. De plus, le groupe d'animaux traités par des particules qualifiées de taille « normale » par Wu *et al.* (2009) n'est pas justifié. En effet, sur la base d'une définition des nanomatériaux qui précise qu'un nanomatériau est défini comme tel s'il possède au moins une dimension inférieure à 100 nm, ces particules qualifiées de taille « normale », 90 nm, entreraient dans le champ de cette définition. Par ailleurs, aucune lésion histopathologique, ni changements des taux enzymatiques ne sont observés avec ces particules alors que Wu *et al.* (2009) concluent que leurs données montrent la présence d'un risque potentiel après exposition topique relativement longue à des NPs de TiO₂. De plus, Wu *et al.* (2009) ne font pas état d'une comparaison avec les NPs de TiO₂ utilisées sur le marché des produits cosmétiques qui sont enrobées ou dopées ou celles utilisées dans cette étude ne le sont pas. En effet, il est important d'utiliser des NPs de TiO₂ enrobées ou dopées dans les études, voire de comparer les effets des NPs enrobées et non enrobées (dopées ou non dopées) afin de pouvoir extrapoler correctement les données à l'homme.

Sadrieh *et al.* (2010) s'intéressent à la pénétration cutanée de quatre formulations (crème) dont trois contiennent :

- 6,1 % de NPs de TiO₂ Degussa P25 (mélange anatase/rutile) non-enrobées (30-50 nm) ;
- 4,7 % de NPs de TiO₂ enrobées (hydroxyde d'aluminium/copolymère de diméthicone) (20-30 nm de diamètre et 50-150 nm de longueur) et ;
- 5,6 % de particules microstructurées de TiO₂ (300-500nm).

La quatrième formulation correspond au contrôle et ne contient donc pas de TiO₂. La méthode de caractérisation des NPs dans les formulations est réalisée par analyse MEB.

Il est à noter que les doses et les formulations choisies dans cette étude sont très similaires à celles utilisées par l'homme dans les produits de protection solaire, dans le but d'obtenir des résultats pertinents et extrapolables à l'homme.

Les animaux utilisés sont des mini-porcs Yucatan femelles âgés de quatre mois au début de l'étude, à raison de 3 animaux par groupe (ou par formulation) soit 12 animaux au total. L'application topique des crèmes a été réalisée 4 fois par jour, 5 jours par semaine durant 22 jours. Chaque crème a été appliquée à une dose de 2 mg/cm² sur le cou, la surface dorsale et la surface ventrale jusqu'au commencement de la queue des mini-porcs (soit au total 176 mg/cm², environ 1,32 L de crème). Plusieurs tissus ont été recueillis 24 heures après la dernière application: la peau sur cinq sites (le cou, la partie latérale du dos, l'abdomen, les régions inguinales gauche et droite, les régions gauche et droite axillaires ; l'épiderme et le derme ont été séparés), les ganglions lymphatiques, le foie, les reins, la vésicule biliaire, le cœur, les poumons, le cerveau. Les fèces (échantillon de la partie supérieure du côlon) ont également été recueillies. La mesure de la distribution des particules a été analysée par ICP-MS. Les ganglions lymphatiques et le foie sont utilisés comme « sentinelles » de la pénétration cutanée du TiO₂, dans le sens où si des particules de TiO₂ sont retrouvées dans ces organes, alors la pénétration cutanée sera avérée.

Au niveau des résultats, les mini-porcs n'ont pas présenté de signes cliniques (type irritatif) après l'application des formulations et ce, quelque soit le groupe. L'analyse histopathologique ne montre aucune anomalie structurale évidente dans les cellules cutanées chez les animaux traités au TiO₂ lorsqu'ils sont comparés aux animaux témoins.

Les organes considérés comme « sentinelles », les ganglions lymphatiques et le foie ont été analysés.

Dans les ganglions lymphatiques inguinaux (droit et gauche), une augmentation statistiquement significative des taux en TiO₂ est rapportée pour les groupes traités avec les formulations contenant les NPs de TiO₂ non enrobées et les particules de TiO₂ submicroniques (300-500 nm). Les auteurs combinent les résultats de tous les ganglions prélevés (inguinaux, pré-capsulaires et sub-mandibulaires) et ne retrouvent aucune augmentation statistiquement significative. Néanmoins, au vu de l'augmentation statistiquement significative des taux en TiO₂ dans les ganglions inguinaux, il n'est pas possible d'éliminer totalement une diffusion potentielle.

Dans le foie, aucune augmentation statistiquement significative des taux en TiO₂ pour tous les groupes traités *versus* le groupe contrôle, n'a été retrouvée.

Dans l'épiderme, des taux significativement élevés en TiO₂ ont été retrouvés pour tous les groupes traités *versus* le groupe contrôle. Ces taux élevés ne sembleraient pas être anormaux d'après les auteurs, au regard de la méthode de rinçage utilisée qui n'ôterait pas le *stratum corneum* or c'est précisément dans le *stratum corneum* que le TiO₂ est présent. Dans le derme, des taux statistiquement élevés en TiO₂ ont été retrouvés pour tous les groupes traités *versus* le groupe

contrôle. Les auteurs émettent l'hypothèse d'une mauvaise séparation de l'épiderme du derme. Ainsi, une partie de l'épiderme serait restée maintenue au derme entraînant l'observation du TiO_2 dans le derme. Des photographies avant et après séparation du derme et de l'épiderme après coloration à l'hématoxyline sont présentes dans la publication et les auteurs montrent sur ces photographies des morceaux d'épiderme liés au derme après séparation. Pour autant il est à noter que c'est dans la zone de l'abdomen, le cou et surtout la région inguinale, que les teneurs les plus importantes, sont retrouvées.

Afin de déterminer si ces taux élevés en TiO_2 dans tous les groupes sont dus à la présence d'épiderme non séparé correctement, à une pénétration du TiO_2 dans le derme ou à une accumulation au niveau du follicule pileux, les échantillons de peau ont été analysés par MET suivie d'une mesure par EDX (« *Energy dispersive X-ray* »). Les résultats montrent une forte densité en TiO_2 dans le *stratum corneum* et moins de 10 particules de TiO_2 isolées ont été retrouvées dans le derme soit 11 mg de TiO_2 /g d'épiderme *versus* 26 $\mu\text{g/g}$ dans le derme. Les auteurs concluent donc à une contamination en particules de TiO_2 du derme par celles contenues dans l'épiderme et non à une absorption du TiO_2 dans le derme.

Les auteurs ne concluent pas sur la présence statistiquement significative de TiO_2 dans les ganglions inguinaux ni sur une diffusion systémique potentielle.

Dans le follicule pileux, un nombre faible de particules de TiO_2 sont retrouvés pour les groupes d'animaux traités par des particules de TiO_2 submicroniques et pour les groupes d'animaux traités par des NPs de TiO_2 non-enrobées. Il est à noter que ces particules ont été détectées dans les parties hautes du follicule pileux.

Les études *in vivo* chez l'animal et en particulier chez le porc constituent un outil indispensable à l'obtention de résultats pertinents à l'extrapolation à l'homme. Néanmoins, les études chez l'homme restent le moyen d'évaluer la pénétration cutanée le plus pertinent. Quelques études ont été réalisées avec des NPs de TiO_2 et de ZnO et seront abordées dans le paragraphe suivant.

4.2.2. Homme

Concernant les études chez l'homme de pénétration cutanée des NPs de TiO_2 et de ZnO présentées dans cette partie, les temps d'exposition restent limités à quelques heures (72 heures).

Lademann *et al.* (1999) réalisent une étude portant sur une émulsion H/E (huile dans eau) contenant du TiO_2 dénommé UV-Titan M 160 (caractéristiques non fournies, mais décrit par le fournisseur Kemira comme du rutile traité en surface, de taille moyenne 17 nm, de surface spécifique 70 m^2/g et de densité 150 kg/m^3). Une quantité de 2 mg/cm^2 (proportion de TiO_2 non précisée) du produit est déposée sur une surface de 160 cm^2 de l'avant bras d'un volontaire, un contrôle sans TiO_2 étant effectué sur l'autre avant-bras, le dépôt est répété pendant 5 jours. La peau est « strippée » 15 fois puis biopsiée. Le TiO_2 est mesuré en surface, dans les couches supérieures du *stratum corneum* (29 $\mu\text{g/cm}^2$ dans les 15 premiers « strips ») et dans les orifices des follicules pileux. Plus en profondeur dans le *stratum corneum*, il est peu détectable (1,35 $\mu\text{g/cm}^2$ jusqu'au strip n°78) et s'accumule dans le follicule pileux. En effet, après observation en microscopie fluorescente, des particules de TiO_2 sont détectées dans les follicules pileux mais non à l'extérieur de ces follicules à savoir dans les cellules vivantes de l'épiderme. Néanmoins, les auteurs précisent que la présence de particules dans le follicule pileux ne peut être interprétée comme un passage de ces particules dans les couches viables de la peau, le follicule pileux étant lui-même recouvert par une couche faisant office de barrière.

Les résultats de l'étude de Pflücker *et al.* (2001) sont concordants avec ceux retrouvés dans l'étude précédente. Cette dernière concerne l'absorption cutanée de NPs de TiO_2 sous trois de ses formes, T 805 de Degussa (20 nm), Eusolex T-2000 de Merck particule primaire 10-15 nm (agrégats 100 nm), Tioveil AQ de Solaveil (10 nm) sous forme d'émulsion à 4 %. Une quantité de 45 mg de l'émulsion est déposée sur l'avant-bras d'un volontaire, sur une surface de 11,3 cm^2 (soit 160 μg de TiO_2/cm^2), pendant 6 heures sans occlusion. Une biopsie est alors effectuée, fixée, et les coupes histologiques sont observées aux microscopes photonique et électronique. En microscopie photonique, les agrégats de TiO_2 sont observés dans un film recouvrant la surface cutanée alors qu'en MET, le TiO_2 n'est pas observé dans les couches plus profondes de la peau.

Par ailleurs, Schulz *et al.* (2002) réalisent une étude chez l'homme qui s'intéresse aux formes et caractéristiques de surface de 3 formes nanométriques de TiO_2 modifié en surface (T 805 20 nm, Eusolex T-2000 10-15 nm pour les particules primaires, agrégats de 100 nm Tioveil AQ 100 nm). Les

particules sont contenues dans une émulsion de type crème solaire, à 4 % de TiO_2 . Une quantité de 45 mg de produit (4 mg/cm^2 , soit $160 \mu\text{g TiO}_2/\text{cm}^2$) sont appliqués sur la peau du bras d'un volontaire pendant 6 h. Après fixation des échantillons, l'observation microscopique montre un dépôt en surface et une absorption limitée aux couches supérieures du *stratum corneum*, sans effet particulier de la taille ou des propriétés de surface. Ces résultats sont confirmés par l'étude de Filipe *et al.* (2009) et celle de Kertesz *et al.* 2005 qui réalisent, dans le cadre du projet européen Nanoderm, une étude d'absorption des NPs de TiO_2 contenues dans un produit solaire (Anthelios XL F60, La Roche-Posay) sur un modèle de xénogreffe de peaux humaines greffées sur des souris SCID. Le produit est déposé pendant 1, 24 ou 48 heures sous occlusion. Des biopsies sont alors prélevées, fixées et préparées pour l'observation microscopique. Après 1 ou 24 heures d'exposition, les NPs sont observées dans les couches les plus externes, atteignant le *stratum corneum disjonctum*. Dans de rares cas, elles atteignent le *stratum granulosum*.

Concernant l'absorption cutanée du ZnO , deux études montrent une pénétration cutanée limitée au *stratum corneum*, voire le *stratum granulosum*. Ainsi, l'étude de Zyvagin *et al.* (2008) porte sur l'évaluation d'un produit qui comporte 19 % de ZnO , sous forme de particules de 26 à 30 nm. Dans sa partie *in vivo*, l'étude est effectuée sur une surface cutanée de 50 cm^2 , sur différentes localisations anatomiques, chez 4 sujets. Une quantité de 0,3 g de produit sont déposés sous occlusion pendant 5 minutes (soit 6 mg de ZnO/cm^2). La peau lavée est observée *in situ* au microscope confocal immédiatement, ou après 4 et 24 heures. Les NPs de ZnO sont observées à la surface de la peau 4 h suivant l'application, dans les couches externes du *stratum corneum*, et jusqu'au *stratum granulosum*. L'étude des peaux après 4h ou 24h d'exposition ne montre pas de pénétration des particules dans l'épiderme, à l'exception d'un cas isolé. La limite majeure de cette observation repose toutefois sur la durée d'exposition très courte, de 5 minutes.

Par ailleurs, l'étude de Filipe *et al.* (2009) confirme ces résultats. Des formulations de types produits solaires contenant du TiO_2 et/ou du ZnO sont appliquées chez l'homme. Le TiO_2 est utilisé soit seul, sous une forme commerciale (émulsion hydrophobe, particules en aiguilles), ou sous forme de gel à base hydrophobe (rutil greffé Eusolex T-2000, 20 nm, aiguilles), soit avec du ZnO (particules sphériques de 20-60 nm). Les formulations sont appliquées pendant 2 heures, correspondant aux recommandations de la Food and Drug Administration (FDA) sur une surface d'environ 25 cm^2 de la région sacrée, à raison de 0,5 à 1 mg/cm^2 , chez 9 individus à peau saine. Après l'exposition, une biopsie est prélevée, fixée et préparée pour l'observation en MEB. Le TiO_2 et le ZnO sont uniformément répartis sur la peau, s'accumulant dans les zones de dépression et les rides. Le TiO_2 est également retrouvé dans le *stratum corneum* mais jamais dans l'épiderme. Le ZnO n'est pas davantage absorbé. L'occlusion pendant 48h, testée chez 10 volontaires, ne modifie pas ce profil d'absorption d'après les auteurs.

L'étude très récente de Gulson *et al.* (2010) a pour objectif de déterminer si le zinc des particules de ZnO est absorbé *via* la peau. Cette étude présente une méthode originale de détection des NPs de ZnO . En effet, les auteurs étudient des particules de ZnO radiomarquées (^{68}ZnO) dont la moitié a été utilisée pour préparer des particules d'une taille d'environ 19 nm et l'autre moitié pour préparer des particules d'une taille moyenne de 110 nm (considérées comme non nano). Ainsi deux groupes de volontaires sont formés : le groupe « nano » (11 volontaires) et le groupe « non-nano » (9 volontaires). Environ 20 % des particules non-enrobées ont été incorporées à une formulation préparée selon un processus commercial. Les formulations sont appliquées (entre $3,7$ et $4,6 \text{ mg/cm}^2$) sur le dos des volontaires une fois par jour, durant 5 jours. Les volontaires s'exposent ensuite au soleil, 30 minutes après l'application, comme recommandé par les fabricants de produits de protection solaire, dans un centre aquatique le premier jour et à la plage durant les quatre jours suivants. Un prélèvement sanguin veineux et un prélèvement urinaire sont réalisés sur les volontaires huit jours avant le début de l'étude, au cinquième jour après exposition mais également 6 jours après la fin de l'étude. Les échantillons sont ensuite analysés par MC-ICP-MS (« *Multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry* »). Ces échantillons sont utilisés afin de mesurer les taux en zinc présents avant l'exposition aux formulations contenant du ZnO et donc de déterminer si une part du zinc présent dans le ZnO est absorbée et est présente au niveau de la circulation sanguine et des urines. Les résultats montrent dans les échantillons sanguins et les échantillons urinaires, une augmentation de la concentration en zinc radiomarké après exposition aux formulations de protection solaire mais également 6 jours après l'exposition. Les auteurs précisent que la majorité du ^{68}Zn appliqué durant les 5 jours sur les volontaires, n'est pas absorbé. L'augmentation des taux en ^{68}Zn est cependant plus importante dans les urines que dans le sang. Les auteurs avancent l'hypothèse d'une contamination des échantillons d'urine lors du prélèvement urinaire, essentiellement pour les femmes volontaires.

Par ailleurs, les urines de quatre des volontaires sont analysées ultérieurement (25-40 jours) et les taux en ^{68}Zn restent augmentés.

Ainsi, les auteurs rapportent que le zinc contenu dans les formulations de protection solaire est absorbé *via* la peau, les follicules pileux ou les glandes sudoripares ou une combinaison des trois et est retrouvé dans la circulation sanguine et les urines. Un des facteurs pouvant augmenter l'absorption, serait la formulation elle-même qui contient des substances connues (isopropyl myristate) pour augmenter l'absorption cutanée d'autres substances. Cependant, les auteurs rapportent que ces taux en ^{68}Zn détectés sont très faibles comparés à ceux normalement présents chez l'homme et représentent 1/1000 du total du taux en zinc présent dans le compartiment sanguin. Par ailleurs, les auteurs précisent qu'il n'est pas possible de déterminer si le ^{68}Zn a été absorbé sous la forme de particules de ZnO ou sous la forme d'ions Zn^{2+} solubles ou les deux. Néanmoins, cette étude a le mérite de mimer en partie l'exposition chez l'homme. Cependant, elle se déroule uniquement sur 5 jours et de surcroît en Australie, l'un des pays où la population est largement exposée aux produits de protection solaire toute l'année.

Toutes ces études ont été réalisées dans le but d'évaluer l'absorption cutanée des NPs de TiO_2 et de ZnO , sur peau saine ou les produits de protection solaire comme tous les produits cosmétiques, ne doivent pas nuire à la santé humaine lorsqu'ils sont appliqués dans des conditions normales et raisonnablement prévisibles d'utilisation, comme le cas des peaux lésées suite à des érythèmes solaires.

4.2.3. Cas particuliers : études sur peaux lésées (études *in vitro* et *in vivo*)

Les peaux lésées, soit par un état pathologique cutané, par exemple les peaux atopiques, le psoriasis, soit par des conditions extérieures telles que l'irritation causée par un produit chimique ou l'érythème provoqué par l'exposition solaire, constituent un cas particulier pour l'évaluation des substances cosmétiques. De même, dans le cas de l'eczéma, la couche cornée est endommagée, ce qui peut provoquer une augmentation de l'absorption cutanée. Néanmoins, cet aspect reste à étudier et il est nécessaire de réaliser des travaux supplémentaires. Certaines études ont été réalisées dans le cadre de l'évaluation de la pénétration cutanée des NPs de TiO_2 et de ZnO sur peaux lésées et sont exposées ci-après. Il est à noter que ces études concernent en majorité le TiO_2 , au regard de sa plus grande utilisation par rapport au ZnO .

Ainsi, Tan *et al.* (1996) réalisent une étude pilote ayant pour but de mesurer l'absorption cutanée de particules de TiO_2 chez des volontaires australiens, habitués à s'exposer au soleil avec des produits de protection solaire. L'étude a impliqué 15 volontaires, exposés à une crème solaire à 8 % de TiO_2 de façon répétée pendant 2 à 6 semaines. Après l'exposition, une biopsie a été effectuée. Une partie décrite comme correspondant au *stratum corneum* est retirée à l'aide de la méthode de « *tape stripping* ». Le TiO_2 est quantifié dans la partie restante de la peau. Les quantités mesurées ne sont pas différentes entre les personnes exposées et les contrôles. Cependant, cette étude est très critiquable méthodologiquement, et n'a pas été suivie par une étude plus complète. Par ailleurs, dans cette étude, les sujets présentent une peau saine et les lésions de la peau sont réalisées mécaniquement.

L'étude de Pinheiro *et al.* (2007) a le mérite d'évaluer la pénétration cutanée de particules de TiO_2 contenues dans un produit de protection solaire sur des volontaires atteints de psoriasis. Les conditions de dépôt, la dose appliquée et la composition de la formulation ne sont pas détaillées. La peau du dos des volontaires est exposée à une formulation commerciale d'un produit de protection solaire contenant des NPs de TiO_2 , aucune caractéristique physico-chimique des NPs n'est fournie dans la publication. Des biopsies sont ensuite prélevées et analysées en STIM et PIXE. La peau des sujets psoriasiques présente une teneur en calcium supérieure à celle des peaux saines, tout au long de l'épiderme. Les teneurs en phosphore ne sont pas clairement définies dans le *stratum corneum* versus les couches viables. La distribution du calcium n'est pas uniforme chez les sujets étudiés. Le TiO_2 atteint des régions plus profondes du *stratum corneum* par rapport à la peau saine. Cependant les particules n'atteignent pas le *stratum granulosum*. Sur des peaux de patients porteurs de psoriasis, la pénétration du TiO_2 dans des couches plus profondes de la peau (en comparaison avec des peaux normales) est probablement liée à la fragilité du *stratum corneum*, dû au manque de cohésion entre les cornéocytes.

L'étude menée par Filipe *et al.* (2009) associe les deux cas présentés dans les travaux précédents. En effet, cette étude comporte une partie réalisée sur peaux lésées mécaniquement, et une autre effectuée chez des patients atteints de psoriasis, exposés pendant 2 heures à des

formulations commerciales ou test contenant du TiO₂ seul ou avec du ZnO. Les NPs de TiO₂ (forme rutil enrobée, taille d'environ 20 nm) et de NPs de ZnO (20-60 nm) présentent presque la même forme sphérique. La peau des volontaires est «strippée» au moins 15 fois, jusqu'à ce que les «strips» soient dépourvus de cornéocytes. Cette étape précède l'application de la formulation cosmétique. Nonobstant ce traitement de la peau, le TiO₂ n'est pas retrouvé dans le *stratum corneum* restant et dans l'épiderme viable. Le même type d'exposition chez des patients atteints de psoriasis (conditions non décrites) montre que les NPs de TiO₂ restent localisées dans les couches externes du *stratum corneum*.

L'étude de Yanagisawa *et al.* (2009) s'intéresse à l'effet des nanoparticules de TiO₂ administrées par voie intradermique sur un modèle murin de peau atopique (souche de souris NCA/Nga). L'injection d'un allergène, l'extrait de mite, mime les lésions de la dermatite atopique. Les nanoparticules de TiO₂ de 15, 50 ou 100 nm (surface 110, 20-25, 10-15 m²/g) sont en suspension dans une solution saline. Une quantité de 20 µg est injectée sur la face ventrale de l'oreille à 8 reprises pendant 17 jours. L'extrait de mite est utilisé comme contrôle positif allergène. Les animaux sont sacrifiés 24 heures après la dernière injection et autopsiés.

Après l'injection, l'extrait de mite provoque :

- un épaissement de la peau ;
- un recrutement des éosinophiles ;
- une dégranulation des mastocytes ;
- une stimulation de la production d'interleukine 4 et une diminution de la production d'interféron gamma et ;
- une augmentation du taux d'immunoglobulines E totales dans le plasma.

L'administration du TiO₂ n'a pas montré des effets similaires par contre, il semble potentialiser ceux observés pour l'extrait de mite et ceci indépendamment de la taille des particules.

L'extrait de mite ou les formes de TiO₂ seuls provoquent une augmentation des taux d'histamine dans le sérum. L'augmentation est potentialisée par la co-administration.

Lorsque la barrière cutanée est franchie, le TiO₂ peut ainsi aggraver les effets inflammatoires caractéristiques des allergènes cutanés dans la dermatite atopique.

Par ailleurs, plus récemment, Senzui *et al.* (2010), ont étudié la pénétration cutanée des NPs de TiO₂ sur peau saine et lésée *in vitro*, sur peau de porc. Le protocole est décrit dans le paragraphe précédent. La peau lésée est obtenue par « stripping ». Comme pour la peau saine, les résultats montrent une absence de pénétration au niveau du derme et de l'épiderme viable.

Enfin, récemment, Szikszai *et al.* (2010) ont étudié la pénétration de NPs de ZnO au niveau de peaux lésées humaines obtenue par « tape-stripping » du *stratum corneum*, traitées 48 heures sous occlusion (protocole décrit plus haut). Les NPs de ZnO sont retrouvés dans le *stratum granulosum* sur 12 sites de peau « strippée » provenant de 3 patients, le *stratum granulosum* étant directement en contact avec l'émulsion. Les auteurs concluent à une absence de pénétration des NPs de ZnO après prélèvement du *stratum corneum* par « tape-stripping ».

4.2.4. Conclusions sur l'absorption cutanée *in vivo*

Les données *in vivo* proviennent essentiellement d'études chez le volontaire. Néanmoins, l'étude *in vivo* récente de Sadrieh *et al.* (2010), chez le porc constitue une étude intéressante. Les auteurs concluent à une pénétration cutanée des NPs de TiO₂, limitée dans la peau. Toutefois, cette étude qui montre la présence de ce composé dans certains ganglions lymphatiques pose la question d'une diffusion systémique.

Il est à noter que l'étude de Wu *et al.* (2009) chez la souris imberbe n'est pas jugée pertinente en raison des nombreux biais relevés et du choix de l'espèce qui ne permet pas d'extrapolation des résultats à l'homme.

Concernant le ZnO, peu d'études sont disponibles comparativement à celles disponibles pour le TiO₂. Or l'étude de Gulson *et al.* (2010), montre l'augmentation statistiquement significative des taux en ⁶⁸Zn mesurés dans le sang et les urines chez le volontaire. Néanmoins, cette augmentation reste faible au regard des taux en zinc présents normalement chez l'homme. Par ailleurs, les auteurs précisent qu'il n'est pas possible de déterminer si le ⁶⁸Zn a été absorbé sous la forme de particules de ZnO ou sous la forme d'ions Zn²⁺ solubles ou les deux.

Par conséquent, il n'est pas possible d'exclure une diffusion systémique des NPs de TiO₂ en raison de leur présence dans certains ganglions lymphatiques. Concernant les NPs de ZnO, il n'est pas possible de conclure à une absence de pénétration cutanée au vu des données disponibles.

En ce qui concerne la peau lésée, les résultats semblent contradictoires et il est probable que toute lésion de la peau de nature pathologique ou exogène puisse favoriser l'absorption des NPs. Il

est à noter que les produits cosmétiques ne doivent pas nuire à la santé humaine lorsqu'ils sont appliqués dans des conditions normales et raisonnablement prévisibles d'utilisation (article 2 de la directive cosmétique 76/768/CEE). Dans le cas des produits de protection solaire, des peaux lésées suite à des érythèmes solaires constituent une éventualité d'application dans des conditions normales et raisonnablement prévisibles d'utilisation. Toutefois, il n'existe pas à ce jour de modèle sur peaux lésées validé. Le CSSC suggère dans son rapport concernant les nanomatériaux (SCCP, 2007) de réévaluer le TiO_2 notamment sous forme nanoparticulaire et d'aborder en particulier le cas des peaux lésées et autant que possible l'impact des effets mécaniques (par exemple la flexion de la peau) sur la pénétration cutanée. A cet effet, quelques études présentent la comparaison des résultats rapportés sur le modèle de peau statique *versus* modèle de peau fléchie. Ces études (Rouse *et al.*, 2007 ; Tinkle *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2008) réalisées sur d'autres types de NPs telles que les fullerènes et les quantum dots, montrent une augmentation de l'absorption cutanée sur peau fléchie *versus* peau statique, il convient donc que des données similaires soient fournies pour les NPs de TiO_2 et de ZnO afin de s'assurer de l'absence de pénétration supplémentaire sur peau fléchie.

Enfin, la question d'une pénétration *via* le follicule pileux reste à l'étude. Récemment, Lademann *et al.* (2010) dans une revue de la littérature, avancent l'hypothèse d'un possible mécanisme de pénétration *via* le follicule pileux. Cependant, les auteurs précisent que les particules pénétreraient dans le follicule pileux après massage (comme lors de l'application d'une crème) et s'accumuleraient dans le follicule pileux pour être finalement éliminées seulement par des processus très longs tels que la croissance du poil ou le flux de sébum.

5. Etudes de génotoxicité

De nombreuses études de génotoxicité des NPs de TiO_2 sont présentes dans la littérature scientifique. La plupart des résultats de ces travaux suggèrent un potentiel génotoxique *in vitro* et *in vivo* direct et/ou indirect des NPs de TiO_2 et de ZnO .

5.1. Etude du potentiel génotoxique

Le test d'Ames permet la détection de mutations géniques dans des cellules procaryotes. Ce test est utilisé par Wahreit *et al.* (2007) sur des souches de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535 et TA1537) et *Escherichia coli* (WP2uvrA) en présence et en absence d'activation métabolique, exposées à des NPs de TiO_2 sous forme rutile enrobées et sous forme anatase/rutile (doses étudiées : 100, 333, 1000, 3333, 5000 μg par plaque et à une concentration de 50 mg/mL). Les résultats indiquent l'absence de potentiel mutagène. Cette étude semble pertinente en termes de méthodes puisque les auteurs suivent les lignes directrices de l'OCDE 471.

Néanmoins, le test d'Ames ne semble pas adapté pour l'évaluation du potentiel mutagène des nanomatériaux car les cellules procaryotes sont incapables de procéder à l'endocytose ; ainsi les nanomatériaux ne peuvent pas diffuser au sein des bactéries (Singht *et al.*, 2009). Par ailleurs, la taille des particules utilisées dans cette étude correspond à 140 nm ce qui ne couvre pas les autres tailles inférieures à 140 nm.

Wang *et al.* (2007) montre dans un essai de mutation génique sur cellules de lymphoblastes humains WIL2-NS/HGPRT un potentiel mutagène des NPs de TiO_2 (taille du volume des NPs : 6,5 nm et à une concentration de 2,5 $\mu\text{g/mL}$).

Wahreit *et al.* (2007) montrent, dans un essai d'aberrations chromosomiques sur cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) des NPs de 140 nm en présence de système d'activation métabolique exogène (doses de 750, 1250, and 2500 $\mu\text{g/mL}$ durant 4 heures) et en absence de système d'activation métabolique exogène (doses : 62,5, 125, and 250 $\mu\text{g/mL}$ durant 20 heures) à une concentration de 50 mg/mL , une absence d'aberrations chromosomiques. Cette étude a été menée selon les lignes directrices OCDE 473.

Par ailleurs, Theogaraj *et al.* (2007) utilisent un test d'aberrations chromosomiques similaire mais cette fois-ci en présence et en l'absence de rayonnements UVA et UVB (750 mJ) sur des cellules CHO exposées à des NPs de TiO_2 enrobées avec des composés organiques et inorganiques (800 à 5000 $\mu\text{g/mL}$) de taille différentes 14-60 nm et sous différentes formes (anatase, rutile et mélange anatase/rutile). Les NPs testées dans cette étude n'induisent pas d'aberrations chromosomiques indiquant ainsi l'absence de potentiel photoclastogène.

Par ailleurs, le test de photoclastogénicité sur cellules CHO (Dufour *et al.*, 2006) a également été utilisé pour évaluer le potentiel clastogène de NPs de ZnO (particules < 200 nm) mais cette fois avec une exposition simulant le rayonnement solaire. Les résultats sont positifs sur :

- les cellules CHO pré-irradiées durant 2-3 heures à 350 mJ/cm² et durant 1-2 heures à 700 mJ/cm² avant traitement par du ZnO ;
- les cellules CHO irradiées (durant 2-3 heures à 350 mJ/cm² et durant 1-2 heures à 700 mJ/cm²) et traitées simultanément par du ZnO.

Néanmoins, la taille des particules utilisées n'est pas précise (< 200 nm).

Rahman *et al.* (2002) réalisent une étude incluant le test de micronoyaux sur des fibroblastes embryonnaires de hamster syrien exposés à des NPs de TiO₂ (< 20 nm) et à des particules de TiO₂ (>200 nm), (concentrations 0,5 ; 1,0 ; 5 et 10 µg/cm² durant 12, 24, 48, 66 et 72 heures). Les résultats montrent une augmentation du nombre de micronoyaux induite aux concentrations comprises entre 0,5 et 5 µg/cm² et à tous les temps d'exposition par les NPs de TiO₂ alors qu'aucune augmentation n'est observée pour les particules de TiO₂ dont la taille est supérieure à 200 nm. Cette étude est intéressante puisqu'elle compare la génotoxicité de particules sous forme nanoparticulaire et sous forme submicronique.

Une autre étude procédant à cette comparaison, a été réalisée par Gurr *et al.* (2005). Elle met en jeu des cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B exposées à des particules de TiO₂ sous forme :

- anatase à 10 et 20 nm ;
- anatase ≥ 200 nm ;
- anatase à 200 nm et ;
- rutile à 200 nm.

L'induction de micronoyaux est observée pour les formes anatase de TiO₂ (10 et 200 nm) mais pas pour les formes anatase (≥ 200 nm et 200 nm) et rutile (200 nm). Ainsi, le potentiel génotoxique évalué par le test de micronoyaux est retrouvé pour les NPs de TiO₂. Néanmoins, les résultats sont négatifs pour les particules de TiO₂ sous sa forme submicronique.

Wang *et al.* (2007) réalisent un test de micronoyaux *in vitro* sur les NPs de TiO₂ (6,5 nm). Les résultats indiquent une augmentation du nombre de micronoyaux après une exposition à une dose de 130 µg/mL, 6 heures après exposition des cellules de lymphoblastes humains (WIL2-NS).

Virgilio *et al.* (2010) montrent sur cellules ovariennes de hamster chinois (lignée CHO-K1) exposées à des NPs de TiO₂ (taille moyenne 20 nm) une légère augmentation de la fréquence de micronoyaux à des doses de NPs comprises entre 0,5 et 1,0 µg/mL. Par ailleurs, les auteurs évaluent également les NPs de TiO₂ dans un test d'échange de chromatides sœurs (SCE) qui s'avère positif après 24 heures pour des concentrations comprises entre 1 et 5 µg/mL.

Ces résultats positifs *in vitro* obtenus par le test des micronoyaux sont également observés dans l'étude récente de Trouillet *et al.* (2009) *in vivo* chez la souris C57Bl/6Jp^{un}/p^{un}. Les animaux ont été exposés *via* l'eau de consommation à un mélange de NPs de TiO₂ (21 nm à des concentrations de 60, 120, 300, and 600 µg/mL) sous forme anatase/rutile (75/25) durant 5 jours. Une quantité de 3 à 7 mL en moyenne d'eau par jour a été consommée par les souris. Les souris ont été traitées à 50, 100, 250 et 500 mg/kg pc.. Les résultats de cette étude montrent une augmentation de la fréquence de micronoyaux à la plus forte dose de 500 mg/kg pc..

Enfin, récemment Shulka *et al.* (2011) réalisent un test des micronoyaux *in vitro* sur cellules épidermiques humaines (A431) avec du TiO₂ sous forme anatase (environ 120 nm après dispersion). Une augmentation statistiquement significative de l'induction de micronoyaux est observée pour les cellules traitées à 0,8 µg/mL, 8 µg/mL et 80 µg/mL.

La revue de Singht *et al.* (2009) fait état d'études de génotoxicité *in vitro* avec des NPs de TiO₂ et de ZnO, utilisant test des comètes (Kang *et al.* (2008), Park *et al.* (2008), Zhu *et al.* (2007)). Les résultats de ces études indiquent des lésions primaires de l'ADN causées par les NPs de TiO₂ et de ZnO sur des lignées cellulaires bronchiques épithéliales (A549 et BEAS-2B). Par ailleurs, Wang *et al.* (2007) réalisent une étude de génotoxicité *in vitro* sur des cellules de lymphoblastes humains WIL2-NS exposées à des NPs de TiO₂ (6,5 nm), à l'aide du test des comètes dont les résultats montrent également la présence de lésions primaires de l'ADN pour des cellules exposées à des doses de NPs de 65 µg/mL.

Enfin, ces résultats *in vitro* positifs sont également retrouvés *in vivo* chez la souris. En effet, Trouillet *et al.* (2010) réalisent le test des comètes sur sang périphérique de souris C57Bl/6Jp^{un}/p^{un}. Les résultats obtenus indiquent la présence de dommages primaires à l'ADN chez des souris traitées par un

mélange de NPs de TiO_2 (21 nm) sous forme anatase/rutile (75/25) non enrobées à la plus forte dose de 500 mg/kg pc..

De même les résultats de l'étude de Sharma *et al.* (2009) sur des cellules issues d'une lignée cellulaire épithéliale cutanée humaine (A431) montrent un potentiel génotoxique des NPs de ZnO à l'aide du test des comètes.

Les études présentées précédemment renseignent peu sur les caractéristiques des NPs utilisées d'une part et d'autre part ces NPs ne sont pas représentatives de celles commercialisées pour l'utilisation dans les produits cosmétiques. Une étude a été publiée récemment (Landsiedel *et al.*, 2010) utilisant des NPs de TiO_2 et de ZnO commercialisées en tant que filtre UV dans les produits cosmétiques.

Cette récente étude comporte des essais *in vitro* et *in vivo* de génotoxicité menés selon les BPL et les lignes directrices OCDE.

Ainsi, deux types de NPs de TiO_2 et de NPs de ZnO à usage cosmétique ont été évalués dans cette étude :

- T-Lite™ SF : NPs de TiO_2 sous forme rutile enrobées d'hydroxyde d'aluminium et de diméthicone/copolymère méthicone (pourcentage de TiO_2 : 79-89 %) ;
- T-Lite™ MAX : NPs de TiO_2 sous forme rutile enrobées de diméthoxydiphénylsilane/polymère de triéthoxycaprylsilane, de silice hydratée et d'hydroxyde d'aluminium (pourcentage de TiO_2 : 69-73 %) ;
- Z-COTE® HP1 : NPs de ZnO enrobées de triéthoxycaprylsilane (pourcentage de ZnO : 96-99 %) ;
- Z-COTE® MAX : NPs de ZnO enrobées diméthoxydiphénylsilane/polymère de triéthoxycaprylsilane.

Les NPs de TiO_2 ont une longueur de 50 nm et une largeur de 10 nm ; les NPs de ZnO ont une taille primaire comprise entre 30 et 200 nm. Pour chaque test, la taille des particules testées a été évaluée après dispersion et donc les agrégats/agglomérats ont été observés (Landsiedel *et al.*, 2010). A la différence d'un grand nombre d'études issues de la littérature scientifique, les particules étudiées sont caractérisées par des méthodes référencées.

Un test d'Ames est réalisé avec des souches de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA102, TA1535 et TA1537) en absence et en présence de systèmes d'activation métabolique exogènes à des doses de 20 à 5000 µg/plaque comme recommandé par la ligne directrice OCDE 471. Les NPs évaluées dans le test d'Ames correspondent à : T-Lite™ SF, T-Lite™ MAX, Z-COTE® MAX. Deux véhicules sont utilisés dans ce test : du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour l'essai standard sur plaques et du sérum de veau fœtal (SVF) pour l'essai de pré-incubation.

Les résultats montrent un faible effet bactériotoxique (légère diminution du nombre de révertants histidine⁺ par rapport aux témoins sans traitement) de T-Lite™ SF dans l'essai standard sur plaques et dans l'essai de pré-incubation à partir de la dose de 2500 µg/plaque en présence de système d'activation métabolique. Aucun effet bactériotoxique n'est observé avec T-Lite™ MAX et Z-COTE® MAX en absence et en présence de systèmes exogènes d'activation métabolique.

Aucune augmentation du nombre de révertants histidine⁺ n'est rapportée pour T-Lite™ SF, T-Lite™ MAX, Z-COTE® MAX que ce soit dans l'essai standard ou dans l'essai de pré-incubation et ce avec ou sans système d'activation métabolique. Une augmentation du taux de mutations a été rapportée pour le contrôle positif. Les auteurs concluent que dans les conditions expérimentales de l'étude, T-Lite™ SF, T-Lite™ MAX, Z-COTE® MAX ne présentent pas d'activité mutagène dans l'essai standard ou dans l'essai de pré-incubation et ce, avec ou sans système d'activation métabolique.

Pour rappel, le test d'Ames ne semble pas adapté pour l'évaluation du potentiel mutagène des nanomatériaux car les cellules procaryotes sont incapables de procéder à l'endocytose ; ainsi les nanomatériaux ne peuvent pas diffuser au sein des bactéries (Singht *et al.*, 2009). Par ailleurs, récemment l'EFSA (*European Food Safety Authority*) a publié un guide « draft » relatif à l'évaluation des risques des nanomatériaux (EFSA, 2011) où il est indiqué que pour les raisons évoquées précédemment par Singht *et al.* (2009), le test d'Ames ne semble pas approprié pour l'évaluation du potentiel mutagène des nanomatériaux. Néanmoins, l'EFSA précise également que dans certains cas (par exemple, l'induction d'ERO, nanomatériaux solubles, nanomatériaux très petits), un test de mutation sur bactéries peut apporter des informations complémentaires dans la démarche d'évaluation du potentiel génotoxique.

Un test de micronoyaux *in vitro* sur des cellules V79 a été aussi réalisé (Landsiedel *et al.*, 2010) avec le T-Lite™ SF. Les auteurs précisent qu'étant donné la nature nanoparticulaire du T-Lite™ SF, il n'est pas nécessaire d'utiliser de systèmes exogènes d'activation métabolique. Le protocole

décrit suit la ligne directrice OCDE 487. Les cellules ont été exposées au T-Lite™ SF, durant 4 et 24 heures. Après avoir réalisé des essais de cytotoxicité et de précipitation, les auteurs déterminent une gamme de doses à tester de 75 à 300 µg/mL pour les cellules exposées 4 heures et une gamme de doses à tester de 18,8 à 75 µg/mL pour les cellules exposées 24 heures.

Les résultats ne montrent aucune augmentation du nombre de cellules micronucléées pour toutes les concentrations testées après 4 et 24 heures d'exposition. Les valeurs rapportées pour les témoins négatifs sont, d'après les auteurs, semblables aux valeurs des témoins historiques du laboratoire. Les témoins positifs traités par de l'éthylméthylsulfonate (EMS) montrent une augmentation significative du taux de micronoyaux. Les auteurs concluent que T-Lite™ SF est considéré comme ne produisant pas de dommages chromosomiques dans les conditions expérimentales de l'étude.

Un test de micronoyaux *in vivo* sur moelle osseuse de souris est également réalisé dans cette étude avec cette fois Z-COTE® HP1. Le protocole suit la ligne directrice OCDE 474. Etant donné l'absence de différence de signes cliniques entre mâles et femelles lors de l'essai préliminaire permettant de déterminer les doses à tester, les auteurs choisissent de n'utiliser que des souris mâles Crl :NMRI âgés de 5 à 8 semaines. Cinq animaux par groupe de doses sont constitués : 15, 30 et 60 mg/kg pc.. Les animaux traités par les doses de 15 et 30 mg/kg pc. sont euthanasiés 24 heures après le traitement et ceux traités par la dose de 60 mg/kg pc. sont euthanasiés 24 et 48 heures après le traitement (2 groupes sont constitués pour cette dose). Les signes cliniques sont observés après le traitement et la moelle osseuse des deux fémurs de chaque animal est prélevée pour analyse après euthanasie des animaux. Les animaux témoins positifs sont traités par de la cyclophosphamide. Les résultats montrent que le taux de micronoyaux observés dans les groupes traités à toutes les doses est proche de celui rapporté pour le groupe témoin négatif. Les auteurs concluent que Z-COTE® HP1 n'induit pas la formation de micronoyaux dans la moelle osseuse de souris dans les conditions de cette étude.

Enfin, un test des comètes sur cellules pulmonaires est réalisé avec le T-Lite™ SF. Des rats mâles Wistar Crl :WI Han âgés de 7 semaines sont traités par inhalation à l'aide d'un aérosol durant 5 jours, 6 heures/jour. Le protocole d'inhalation et la mesure des particules inhalées sont décrits dans la publication (Landsiedel *et al.*, 2010). Quatre groupes de trois animaux par groupe (dont un groupe témoin négatif) sont constitués et traités aux doses de 0 ; 0, 5 ; 2 et 10 mg T-Lite™ SF/m³. Les signes cliniques, la moyenne des poids corporels et les changements de la moyenne des poids corporels ne sont pas différents pour les groupes traités par rapport au groupe contrôle. Le liquide broncho-alvéolaire de chaque animal est prélevé pour analyse : de légères augmentations des taux des neutrophiles, des monocytes, des protéines totales et de légères augmentations des activités de la lactate déshydrogénase (LDH), de la gamma-glutamyltransférase, des phosphatases alcalines (PAL) et du N-acétyl-béta-D-glucosaminidase sont rapportées pour les groupes traités par des doses de 2 et 10 mg T-Lite™ SF/m³. Ces augmentations sont réversibles trois semaines après la dernière exposition sauf pour le groupe traité par 10 mg T-Lite™ SF/m³ où l'on observe la persistance de changement dans l'activité de la LDH et des PAL. Ainsi, les auteurs choisissent de n'évaluer les lésions potentielles de l'ADN à l'aide du test des comètes que pour ce groupe traité à 10 mg T-Lite™ SF/m³. Après anesthésie des animaux, les poumons sont prélevés et perfusés *in situ*, le test des comètes est ensuite réalisé sur cellules pulmonaires. Les résultats montrent que le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes n'augmente pas pour le groupe traité *versus* le groupe contrôle. Ainsi, les auteurs concluent à une absence d'induction de dommages à l'ADN dans le poumon des rats traités par 10 mg T-Lite™ SF/m³ trois semaines après exposition.

Il est à noter que les résultats montrent clairement une nette diminution de l'ensemble de ces paramètres pour les cellules issues des animaux traités. A titre d'exemple, la moyenne de l'intensité de fluorescence dans la queue de la comète issue des animaux traités est de 3,04 alors qu'elle est de 6,50 dans les témoins négatifs. Cette diminution est observée pour l'ensemble des résultats. Connaissant la forte sensibilité du test des comètes et la capacité de ce test à détecter par exemple l'effet d'agents pontants (qui diminuent le niveau de ces paramètres), la pertinence biologique de ces résultats devrait être discutée par les auteurs.

Par ailleurs, plusieurs remarques peuvent être formulées sur cette étude :

- Les animaux ont été traités 23 jours avant le prélèvement alors que le test des comètes doit être réalisé moins de 4 heures après le dernier traitement. En effet, s'il y a eu des lésions de l'ADN, soit les cellules ont réparé leurs lésions, soit elles se sont multipliées en produisant éventuellement des mutations, soit elles sont mortes de nécrose ou d'apoptose, mais on ne peut en aucun cas espérer mettre en évidence des cassures de brins d'ADN.
- Un faible nombre d'animaux (3 par groupe) a été utilisé.

- Une seule dose a été étudiée, ainsi s'il y a présence d'une relation dose effet en cloche (ce qui n'est pas exceptionnel dans ce type de test), l'effet ne pourra pas être observé.
- Aucun témoin positif n'a été utilisé, ainsi le protocole ne peut pas être validé.
- Aucune enzyme bactérienne (fpg et/ou hOGG1) capable de mettre en évidence les lésions oxydatives, n'a été utilisée or les lésions génotoxiques relatives à la plupart des nanoparticules sont de nature oxydative.

Landsiedel *et al.* (2010) n'évaluent pas le potentiel génotoxique des 4 substances T-Lite™ SF, T-Lite™ MAX, Z-COTE® HP1, Z-COTE® MAX. La substance T-Lite™ SF a été en fait utilisée dans 3 modèles (test d'Ames, test du micronoyau *in vitro* et test des comètes) et les trois autres substances n'ont été étudiées que dans un seul modèle (le test d'Ames pour les substances T-Lite™ MAX et Z-COTE® MAX et le test de micronoyaux *in vivo* pour la substance Z-COTE® HP1).

Les études de génotoxicité exposées précédemment montrent des résultats contradictoires. L'étude de Landsiedel *et al.* (2010) reste à ce jour la plus pertinente, néanmoins il n'est pas possible de conclure sur le potentiel génotoxique des NPs de TiO₂ et de ZnO de manière générale, l'évaluation devant être réalisée au cas par cas.

Certains auteurs ont tenté d'expliquer la positivité de leurs résultats. Ainsi, l'induction de dommages à l'ADN par les NPs de TiO₂ est expliquée par les auteurs des études comme résultant d'un mécanisme indirect de génotoxicité : la formation d'un stress oxydant générant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont des espèces radicalaires (en particulier le radical hydroxyle [•]OH) susceptibles de causer des dommages à l'ADN et notamment l'oxydation des bases de l'ADN et des cassures des brins d'ADN. Il est cependant à noter que les NPs de TiO₂ possèdent également un potentiel génotoxique direct.

5.2. Etude du mécanisme de génotoxicité

Outre leur utilisation dans les produits cosmétiques et notamment en tant que filtre UV dans les produits de protection solaire, les NPs de TiO₂ sont également utilisées dans d'autres domaines industriels afin de dépolluer l'eau et l'air mais également pour créer des surfaces autonettoyantes (augmentation de la durée entre deux nettoyages d'une surface), en raison de leurs propriétés photocatalytiques. Ces propriétés photocatalytiques entraînent la formation d'espèces radicalaires dont le radical hydroxyle [•]OH très réactif et aussi de l'oxygène singulet, une espèce réactive de l'oxygène non radicalaire. Le radical hydroxyle fortement réactif est capable de réagir efficacement avec le 2-désoxyribose de l'ADN pour engendrer des cassures simple brin et avec les bases nucléiques de l'ADN et de produire ainsi des bases modifiées. Une des lésions prédominantes engendrées par le radical hydroxyle dans l'organisme, correspond à la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) par oxydation de la guanine. La lésion 8-oxoG peut être mise en évidence par le test des comètes modifié qui implique une incubation de l'ADN avec des enzymes bactériennes (par exemple, la formamidopyrimidine glycosylase) ou humaines (l'OGG1 ou 8-oxoguanine ADN glycosylase). On peut aussi utiliser l'endonuclease III, autre enzyme de réparation qui convertit les bases pyrimidiques oxydées en cassures simples de l'ADN. Par ailleurs, il est à noter que le niveau de 8-oxoG peut également être mesuré par une méthode plus spécifique, en l'occurrence la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), couplée à une détection électrochimique ou par spectrométrie de masse. Enfin, il existe d'autres moyens plus indirects de mettre en évidence les effets moléculaires d'un stress oxydant : l'activité d'enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase (SOD) et catalase) ou d'autre piègeurs d'ERO (par exemple le N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (N-MPG)), les taux en glutathion ou des marqueurs de la peroxydation lipidique.

Ainsi, Gurr *et al.* (2005) montrent que dans des cellules BEAS-2B, des NPs de TiO₂ anatase de 10 et 20 nm induisent des dommages oxydatifs de l'ADN (à l'aide du test des comètes modifié en ajoutant les enzymes bactériennes), une peroxydation lipidique (*via* la mesure du malondialdéhyde (MDA) qui est un produit de dégradation de peroxydes lipidiques), l'augmentation des taux de peroxyde d'hydrogène et d'oxyde nitrique en l'absence d'exposition au rayonnement UVA et UVB. Les auteurs (Gurr *et al.* 2005) montrent également que les particules de TiO₂ de taille supérieure à 200 nm ne produisent pas de stress oxydant. Cependant, concernant la forme rutile, les résultats sont incohérents. En effet, les résultats sont négatifs sauf pour la production de peroxyde d'hydrogène dont le niveau stationnaire augmente en présence de la forme rutile.

Reeves *et al.* (2008) confirment ces résultats, en étudiant l'effet oxydant des NPs de TiO₂ d'une taille de 5 nm sous forme cristalline anatase, sur des cellules de poissons GFSk-S1 à l'aide du

test des comètes modifié dont les résultats montrent l'induction de dommages à l'ADN. On peut ajouter qu'une méthode de détection qualitative de génération d'espèce radicalaires (résonance paramagnétique électronique, ESR) a été utilisée dans cette étude et a montré la présence du radical $\cdot\text{OH}$.

Il est à noter que ces deux études sont effectuées en l'absence d'exposition des NPs au rayonnement UVA et UVB et par là-même sans l'implication de mécanisme de photocatalyse. Ainsi, les NPs de TiO_2 sont capables de générer la formation d'espèces radicalaires en l'absence d'activation de TiO_2 par les rayons UV. Par ailleurs, la forme cristalline étudiée dans ces deux études correspond à l'anatase.

Sayes *et al.* (2006) montrent la formation d'ERO par une méthode de chimioluminescence en utilisant le luminol, l'augmentation de la luminescence des échantillons suggérant la présence d'un stress oxydant, généralement interprété comme résultant de la présence de radicaux $\cdot\text{OH}$ après exposition au rayonnement UVA (longueur d'onde considérée comme non toxique pour les cellules : 356 nm), de fibroblastes cutanés humains (HDF) et cellules épithéliales bronchiques humaines (A 549) incubées en présence de NPs de TiO_2 d'anatase (10,1 nm), de rutile (5,2 nm) et d'un mélange d'anatase/rutile (3,2 nm). L'objectif de cette étude étant de montrer une relation entre les propriétés photocatalytiques des NPs de TiO_2 et leur phototoxicité. L'anatase montre des propriétés photocatalytiques plus importantes que celles du mélange anatase/rutile ou de la forme rutile seule. La forme rutile n'entraîne la génération d'un stress photooxydant qu'avec des cellules traitées avec des concentrations élevées de NPs, soit 1500 et 3000 $\mu\text{g/mL}$.

Les travaux de deux études *in vivo* sur le stress oxydant ont été rapportés dans la littérature. Ainsi, l'étude de Wu *et al.* (2009), décrite précédemment montre la présence de dommages oxydatifs chez des souris BALB/c imberbes (« *hairless* »). Les NPs de TiO_2 utilisées sont soit de l'anatase (de 4 et 10 nm), du rutile (de 25, 60 et 90 nm), ou la forme mixte de Degussa P25 (21 nm), sans modification de surface. Les auteurs étudient l'activité de la SOD (enzyme antioxydant) et les taux en MDA (marqueur de la peroxydation lipidique). Les résultats indiquent une diminution de l'activité de la SOD et une augmentation des taux de MDA dans la peau et le foie des souris indiquant la présence de processus oxydatifs pour tous les groupes traités. Il est à noter que ces taux élevés en MDA et la diminution de l'activité de la SOD sont plus importants pour la forme anatase que rutile.

L'étude de Trouiller *et al.* (2009) montre la présence de 8-oxoG formé dans l'ADN de foie de souris C57Bl/6Jp^{un}/p^{un} traitées par des NPs de TiO_2 (21 nm) sous forme mixte anatase/rutile par une mesure par CLHP. Les résultats indiquent une augmentation du taux de 8-oxoG dans le foie pour le groupe traité à la plus forte dose de NPs (500 mg/kg pc.).

Enfin, récemment, Shulka *et al.* (2011) étudient le potentiel génotoxique de NPs de TiO_2 *in vitro* à l'aide du test des comètes modifié (ajout d'enzymes bactériennes permettant la détection de dommages à l'ADN dus à un stress oxydant). Les NPs étudiées correspondent à du TiO_2 sous forme anatase sans enrobage. Les résultats du test des comètes montrent que ces NPs de TiO_2 produisent des dommages oxydatifs à l'ADN sur des cellules épidermiques humaines (A431). Par ailleurs, les auteurs mesurent les dommages oxydatifs à l'aide d'une sonde fluorescente DCFDA et mesurent des marqueurs indirects du stress oxydatif (taux en glutathion et taux en hydroperoxyde). Ainsi, la sonde DCFDA détecte une augmentation de la production d'ERO pour les cellules traitées par les NPs de TiO_2 . Une diminution statistiquement significative du taux de glutathion est observée à des doses de 8 et 80 $\mu\text{g/mL}$ pour des cellules A431 exposées à des NPs de TiO_2 durant 6 heures. Enfin, les auteurs observent une augmentation concentration-dépendante du taux de peroxyde d'hydrogène pour les cellules traitées à 8 et 80 $\mu\text{g/mL}$.

Malgré un nombre important d'études qui ont pour objectif la détermination du rôle de la taille des NPs sur l'activité biologique et donc indirectement l'importance des propriétés physico-chimiques et de surface ; l'utilisation de doses appropriées nécessite d'être considérée. Ainsi, par exemple afin de déterminer l'effet de la taille des NPs sur l'activité biologique, les comparaisons de l'activité ou de la réponse biologique doivent-elles être basées sur la masse de l'échantillon comme cela est effectué généralement dans les études de toxicologie ou sur la surface d'activité lors de la comparaison des effets engendrés par différentes tailles de NPs.

Ainsi, l'étude de Jiang *et al.* (2008) a pour but d'évaluer la relation entre les propriétés physico-chimiques (taille, surface d'activité, forme cristalline) du TiO_2 sous forme nanoparticulaire et le potentiel de génération d'un stress oxydant (évalué en utilisant la sonde fluorescente carboxy-H2DCFDA).

Le tableau 1 résume les différents types de NPs de TiO_2 évalués dans l'étude de Jiang *et al.* (2008). Il est à noter que deux concentrations différentes de suspensions par échantillon de TiO_2 ont été

étudiées : 50 et 100 µg/mL. Par ailleurs, différentes méthodes de synthèse de ces échantillons de NPs ont été utilisées (développées dans l'article).

Tableau 1 : Résumé des différents types de NPs de TiO₂ évalués dans l'étude de Jiang *et al.* (2008)

Numéro	Phase cristalline	Surface spécifique d'activité (m ² /g) (BET ^a)	Diamètre des particules (nm)	Taille primaire (nm) (MET ^b)	Taille des particules (XRD ^c)
1	100 % anatase	426,1	4	5 ± 1	3,2
2	100 % anatase	209,6	7	8 ± 2	7,7
3	100 % anatase	155,7	10	11 ± 3	10,4
4	100% anatase	95,80	16	15 ± 4	19,7
5	100 % anatase	51,93	30	30 ± 9	29,1
6	100 % anatase	38,86	40	40 ± 12	30,3
7	100 % anatase	31,52	50	48 ± 14	41,2
8	100 % anatase	14,99	104	98 ± 29	42,0
9	100 % anatase	8,033	195	182 ± 29	67,1
10	82 % anatase / 18 % rutile	25,48	60	56 ± 17	40,9
11	80 % anatase/ 20 % rutile	57,44	27	26 ± 8	23,1
12	65% anatase/ 35 % rutile	29,27	51	53 ± 16	41,0
13	61 % anatase/ 39 % rutile	38,08	39	38 ± 11	31,8
14	55 % anatase/ 45% rutile	35,95	41	40 ± 12	32,9
15	40 % anatase/ 60% rutile	38,23	38	40 ± 12	31,3
16	39% anatase/ 69 % rutile	31,37	47	45 ± 13	32,7
17	29 % anatase/ 71 % rutile	43,12	34	35 ± 10	26,9
18	4 % anatase/ 96 % rutile	19,43	73	-	32,1
19	100 % rutile	13,78	102	-	-
20	amorphe	482,3	3	-	-
21	amorphe	34,33	41	45 ± 13	-
22	Amorphe	26,67	53	59 ± 21	-

a Brunauer-Emmett-Teller nitrogen-gas absorption method

b Microscopie électronique à transmission

c X Ray Diffraction

Concernant les effets de taille des NPs de TiO₂, les résultats indiquent que les particules d'une taille de 30 nm montrent la plus forte activité en matière de génération d'ERO. Les auteurs précisent que cette forte activité semblerait être corrélée aux propriétés photocatalytiques du TiO₂ qui ont été montrées comme étant plus importantes à une taille comprise entre 25 et 40 nm. Par ailleurs, les auteurs établissent une relation entre la taille et la génération d'ERO : pour les tailles inférieures à 10 nm et supérieures à 30 nm, l'activité des particules générant des ERO reste relativement constante alors que pour des tailles de 10 à 30 nm, les auteurs observent une augmentation de l'activité en termes de génération d'ERO.

Les différentes formes cristallines évaluées sont : amorphe, anatase, rutile et des mélanges anatase/rutile selon différents ratios. Une comparaison des potentiels de génération d'ERO des NPs de TiO_2 sous la forme amorphe (3 nm) *versus* anatase (4 nm) est effectuée. Les résultats indiquent une activité de génération d'ERO supérieure pour la forme amorphe par rapport à celle de la forme anatase. Pour les particules dont la taille est supérieure à 30 nm, une comparaison de 13 échantillons de différentes tailles et de différentes formes a été effectuée. Les résultats indiquent que la forme amorphe montre la plus forte activité génératrice d'ERO par rapport à la forme anatase pour la même taille des particules, ce qui est en accord avec les résultats rapportés pour les particules dont la taille est inférieure à 10 nm. Par ailleurs, parmi les treize échantillons testés d'une taille supérieure à 30 nm, la forme 100 % anatase montre clairement une activité génératrice d'ERO supérieure aux mélanges anatase/rutile et à la forme 100 % rutile. En ce qui concerne les différents ratios des mélanges anatase/rutile, l'activité génératrice d'ERO diminue d'autant plus que la fraction rutile dans le mélange augmente.

Les auteurs tentent d'expliquer ces différents résultats. Ainsi, l'activité photocatalytique n'est pas directement proportionnelle à la surface d'activité mais aux nombres de sites actifs. Selon, les auteurs, cette relation est applicable au potentiel générateur d'ERO des NPs de TiO_2 . Les défauts en sites actifs dans la structure cristalline des nanomatériaux jouent un rôle important dans la génération d'ERO. Ainsi, la densité en défauts de sites actifs est constante pour les NPs dont la taille est supérieure à 30 nm et inférieure à 10 nm alors qu'elle diminue pour les particules dont la taille est comprise entre 10 et 30 nm. Ces variations en sites actifs dépendent fortement de la méthode de synthèse des NPs, de ce fait les auteurs mettent en garde contre des comparaisons trop hâtives d'échantillons fabriqués avec différentes méthodes de synthèse.

L'étude de Van der Meulen (2007) montre en partie les mêmes résultats que l'étude de Jiang *et al.* (2008). En effet, cette étude qui a pour objectif de mesurer l'oxydation photocatalytique du propane par des NPs de TiO_2 sous forme anatase et rutile seules et sous forme mixte anatase/rutile, montre que la forme mixte aurait des propriétés photocatalytiques plus importantes que celles observées pour les formes anatase et rutile seules. Ainsi, les auteurs rapportent un effet synergique lorsque les deux formes cristallines sont utilisées en mélange.

En ce qui concerne le ZnO, Sharma *et al.* (2008) étudient la génération d'un stress oxydant de NPs de ZnO (30nm) sur une lignée cellulaire épidermique humaine A431. Divers marqueurs du stress oxydants sont ainsi évalués tels que le taux en glutathion, la peroxydation lipidique, l'activité de la catalase et l'activité de la SOD.

Des diminutions de l'activité de la catalase et de la SOD sont observées pour des cellules traitées à 0,008 ; 0,08 et 0,8 $\mu\text{g/mL}$ mais également des diminutions des taux de glutathion ont été observées pour des cellules traitées à 0,08 et 8 $\mu\text{g/mL}$. Une augmentation du taux de peroxyde d'hydrogène (peroxydation lipidique) a également été notée pour les cellules traitées à 0,008 $\mu\text{g/mL}$.

Par ailleurs, l'étude récente de Huang *et al.* (2010) cherche à expliquer la cytotoxicité observée par des NPs de ZnO (20 nm) dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B). Les résultats montrent une augmentation des taux en ERO (mesurés en utilisant la sonde fluorescente carboxy-H₂DCFDA) après 6 et 24 heures d'exposition aux NPs de ZnO à toutes les doses (5, 6, 7, 8, 9 et 10 $\mu\text{g/mL}$). De plus, le co-traitement des cellules avec de la N-acétyl-cystéine (NAC, précurseur du glutathion, piègeur d'ERO) augmente la viabilité cellulaire. De même, l'étude montre que l'expression de certains gènes impliqués dans les réponses cellulaires au stress oxydant est altérée par les NPs de ZnO. Enfin, la mesure des taux en calcium intracellulaire afin de déterminer l'influence du stress oxydant sur l'homéostasie du calcium indique une augmentation des taux en calcium intracellulaire qui toutefois diminuent en présence de NAC et de nifédipine (inhibiteur des canaux calciques).

Ainsi, cette étude montre la production d'ERO par les NPs de ZnO, *in vitro* dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) mais également l'augmentation des taux de calcium intracellulaire. D'autre part, le co-traitement des cellules par la NAC entraîne une diminution partielle des taux en calcium intracellulaire suggérant l'influence des ERO dans l'homéostasie du calcium intracellulaire.

Ces études montrent la présence d'un mécanisme de génotoxicité indirect impliquant la génération d'un stress oxydant. Néanmoins, l'étude récente de Li *et al.* (2010) montre *in vivo* chez la souris, la présence de dommages directs à l'ADN dans le foie générés par des NPs de TiO_2 d'anatase, résultant d'un mécanisme direct de génotoxicité. Dans cette étude, des souris CD-1 (ICR) sont traitées quotidiennement par voie intrapéritonéale durant 14 jours par des NPs de TiO_2 sous forme anatase (taille de 5 nm) à différentes doses (5, 10, 50, 100 et 150 mg/kg pc.). Les foies sont

ensuite prélevés et analysés. Les résultats montrent, à l'aide d'une analyse du spectre d'absorption, qu'une liaison du métal titane (Ti^{4+}) avec les nucléotides est présente dans le foie. Par ailleurs, dans le but d'étudier les sites de liaison du Ti^{4+} avec les nucléotides, les auteurs montrent par une méthode utilisant les rayons X que le Ti^{4+} se lie à trois atomes d'oxygène ou d'azote et deux atomes de phosphore. Par ailleurs, l'analyse de la conformation de l'ADN à l'aide de l'étude du spectre UV de dichroïsme circulaire, révèle que les NPs TiO_2 sous forme anatase (taille de 5 nm) causent des changements dans la conformation de l'ADN dans le foie de souris traitées aux doses de 50, 100 et 150 mg/kg pc..

Par conséquent, les résultats des études présentées précédemment indiquent la présence d'un potentiel génotoxique indirect dû à la génération d'ERO. Ce stress oxydant serait en partie dû aux propriétés photocatalytiques du TiO_2 (activées par les UV). Les industriels de la cosmétologie cherchent à empêcher la génération d'ERO (US EPA, 2009) et en particulier d'espèces radicalaires ($^{\bullet}OH$) susceptibles d'endommager l'ADN dans les produits de protection solaire, d'autant plus que ce phénomène est amplifié par les propriétés photocatalytiques (génération aussi d'oxygène singulet) des NPs de TiO_2 et de ZnO donc se produit principalement sous irradiation UV. Il est à noter que la génération d'un stress oxydant et par là-même d'ERO constitue un mécanisme commun aux NPs en général (Afsset, 2010), qu'elles aient ou non des propriétés photocatalytiques.

5.3. Etudes d'efficacité des enrobages des nanoparticules : prévention des effets génotoxiques

Ainsi, pour diminuer ces effets non recherchés, les industriels utilisent des NPs enrobées de substances organiques (alcoxy titanates, silanes, méthyl polysiloxanes) et inorganiques (alumine, silice, zircon). Ces enrobages empêchent et/ou réduisent la formation des ERO avant qu'elles puissent réagir avec les autres substances de la formule et les molécules viables de la peau (Tiano *et al.*, 2010). Par ailleurs, outre l'enrobage des NPs pour lutter contre les ERO, les industriels de la cosmétique ajoutent des antioxydants tels que de l'alpha-tocophérol (vitamine E), de l'acide ascorbique ou de la beta-carotène (Buchalska *et al.*, 2010). Enfin, comme indiqué précédemment dans les études de génotoxicité, la forme anatase des NPs de TiO_2 possède un potentiel photocatalytique plus important que la forme rutile et par là-même une cytotoxicité plus importante. De ce fait, les industriels s'attachent à utiliser la forme rutile ou un mélange anatase/rutile pour réduire la production d'ERO (US EPA, 2009).

En 2008, Barker et Branch évaluent l'activité photocatalytique de NPs de TiO_2 isolées de produits de protection solaire commercialisés en Australie. Les auteurs étudient l'effritement de la peinture dû à un contact avec certaines formulations de produits de protection solaire. Parmi les 5 formulations analysées, 4 formulations contiennent des NPs de TiO_2 sous forme cristalline mixte anatase/rutile et 1 sous forme cristalline rutile. Les NPs de TiO_2 isolées sous forme cristalline mixte anatase/rutile présentent une activité photocatalytique, les NPs de TiO_2 sous forme cristalline rutile sont photostables. Toutefois, la composition des enrobages n'est pas précisée même s'il est important de noter que ces NPs analysées sont issues de produits de protection solaire commercialisés en 2006 en Australie. Le rapport de l'U.S. EPA (2009) précise néanmoins que les NPs de TiO_2 sous forme cristalline rutile correspondent à des NPs dopées par du manganèse.

Certains auteurs se sont intéressés à l'efficacité de ces enrobages vis-à-vis de la production d'ERO. Ainsi, Tiano *et al.* (2010) étudient l'induction de processus photooxydatifs, suite à une exposition au rayonnement UVA, de différents types de NPs de TiO_2 *in vitro* sur plusieurs modèles cellulaires dont une lignée de fibroblastes cutanés humains. Plusieurs formes de TiO_2 sont utilisées dans cette étude afin de comparer leurs propriétés photocatalytiques et de pouvoir évaluer la forme d'enrobage la moins efficace en termes de génération d'ERO :

- TiO_2 sous forme anatase (10-20 nm) ;
- TiO_2 sous forme rutile : dopées par du manganèse (20-100 nm) ou enrobées par de l'hydroxyde d'aluminium (20-40 nm) ou enrobées par un mélange d'alumine, d'hexametaphosphate de sodium, du polyvinylpyrrolidone et du phosphate d'aluminium (20 nm) ou encore enrobées d'alumine et de diméthicone (20 nm) et ;
- un mélange anatase/rutile (80/20, m/m) (20 nm) enrobées par un mélange de glycérine, isolaureth-4-phosphate, vinyl buth-25/copolymère de maléate de sodium.

Comme évoqué précédemment, la forme anatase seule ou mélangée avec la forme rutile apparaît comme la plus photocytotoxique pour les lignées cellulaires par rapport aux autres formes. Au niveau

de la taille des NPs utilisées dans cette étude, celle-ci ne semble pas influencer sur les propriétés photocatalytiques, autrement dit, les différences observées ne sont pas assez significatives pour justifier l'interprétation de l'activité photocatalytique basée sur la taille. Les résultats de cette étude montrent que la forme anatase seule ou en mélange anatase/rutile, enrobée ou non enrobée présentent des propriétés fortement photocatalytiques. Par ailleurs, certains enrobages semblent plus efficaces que d'autres pour limiter les effets photocatalytiques des NPs de TiO_2 . Ainsi, l'alumine et le dopage au manganèse ou bien le mélange alumine/diméthicone constituent des enrobages efficaces.

Une autre étude récente de Buchalska *et al.* (2010) s'intéresse à l'activité photocatalytique des NPs de TiO_2 issus de laits de protection solaire, en isolant des composés insolubles contenant du TiO_2 . Ainsi, trois échantillons sont recueillis : S1 (6,4 % TiO_2 (rutile) + ZnO (würtzite)), S2 (15,9 % TiO_2 (rutile)) et S3 (37,5 % TiO_2 (anatase+rutile)). L'objectif premier de cette étude consiste en la mise en évidence de la génération de l'oxygène singulet par les NPs de TiO_2 isolées de ces différents produits. Les résultats montrent une faible capacité de production de radicaux libres et d'oxygène singulet par ces échantillons TiO_2 qui, d'après les auteurs, seraient dus à la présence de composants organiques capables de piéger les radicaux libres.

Deux points importants sont à soulever au sujet de ces enrobages : d'une part leur stabilité en fonction du pH ou de la température et d'autre part de leur toxicité intrinsèque. Ainsi, le CSSC dans son avis de 2000 (SCCP, 2000) précise que la stabilité de certains enrobages utilisés a été évaluée par les industriels : enrobages soumis à des variations de pH et de température. Le CSSC précise que les enrobages testés ont été rapportés comme stables sous différentes conditions de stress. Néanmoins, outre la stabilité de ces enrobages le CSSC (SCCP, 2000) suggère que la toxicité de ces enrobages soit évaluée comme n'importe quelle substance cosmétique.

5.4. Conclusions sur la génotoxicité

Les résultats des travaux présentés précédemment tendent à montrer un potentiel génotoxique et phototoxique des NPs de TiO_2 et de ZnO . Il est à noter que la plupart de ces études concerne plus particulièrement les NPs de TiO_2 . En effet, les NPs de TiO_2 possèdent des propriétés photocatalytiques entraînant la formation d'ERO (dont des espèces radicalaires mais aussi l'oxygène singulet) susceptibles d'endommager l'ADN. Cette capacité à former des ERO responsables de la cytotoxicité et de la présence de dommages de l'ADN *in vitro*, est démontrée par les résultats des études précédentes. La production d'ERO serait due aux propriétés photocatalytiques des NPs de TiO_2 d'une part mais également à leurs propriétés de surface d'autre part (Gurr *et al.* 2005 ; Fenoglio *et al.*, 2009 ; Hussain *et al.*, 2009). Néanmoins, la plupart des auteurs concluent que l'anatase reste la forme la plus cytotoxique notamment par ses propriétés photocatalytiques (Jiang *et al.*, 2008).

Il est généralement admis qu'un grand nombre de nanomatériaux produisent des ERO. Néanmoins, il n'est souvent pas précisé si les particules employées sont enrobées ou non (mises à part certaines études très récentes), voire même dopées par du manganèse par exemple, or c'est précisément cet enrobage et ce dopage que les industriels de la cosmétique semblent utiliser afin d'empêcher et/ou minimiser la génération d'ERO. De plus, les industriels peuvent également ajouter des systèmes antioxydants (vitamine E par exemple) afin de piéger les possibles ERO produites. Enfin, la forme rutile reste très utilisée pour les NPs de TiO_2 car considérée comme moins photoréactive donc moins susceptible de produire des ERO or de nombreuses études s'attachent à étudier la forme anatase seule même *in vivo* (Li *et al.*, 2010).

Très peu d'études de génotoxicité sont menées *in vivo* (Trouiller *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2010 ; Landsiedel *et al.*, 2010). Des effets génotoxiques directs ont également été observés. Par ailleurs, les effets sont observés à de très fortes doses pour ces deux études (Trouiller *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2010). De plus, les NPs utilisées ne correspondent pas à celles utilisées sur le marché des produits cosmétiques. Enfin, les NPs sont administrées aux animaux *via* l'eau de consommation or ce type de NPs sédimentent rapidement dans l'eau, les doses testées peuvent être ainsi maximisées (Landsiedel *et al.*, 2010).

Ce manque d'études *in vivo* et tous les arguments précédents qui reposent principalement sur des études *in vitro* ne permettent pas de confirmer les résultats observés *in vivo*. Toutefois, la récente étude de Landsiedel *et al.* (2010) *in vitro* et *in vivo* semble montrer des résultats négatifs pour un certain type de NPs de ZnO et de TiO_2 enrobées même si le potentiel génotoxique de ces NPs n'a pas été évalué dans une batterie complète de tests de génotoxicité.

Par conséquent, une évaluation de la génotoxicité des NPs au cas par cas est indispensable étant donné l'impact des propriétés physico-chimiques sur la modulation des résultats.

6. Etudes de cancérogenèse

Deux voies d'exposition sont à prendre en compte en ce qui concerne les NPs de TiO_2 et de ZnO contenues dans les produits de protection solaire : d'une part la voie cutanée, étant donné l'application topique des produits de protection solaire mais d'autre part la voie respiratoire puisque ces derniers peuvent être utilisés sous forme de « sprays » aérosol.

Deux méthodes d'exposition sont généralement utilisées pour évaluer la toxicité des particules par voie respiratoire : l'inhalation et l'instillation. L'instillation peut être intratrachéale ou intranasale. L'inconvénient de l'instillation repose sur l'anesthésie des animaux qui est nécessaire et qui peut affecter la rétention et la clairance des particules testées (U.S. EPA, 2009). Par ailleurs, cette voie d'administration ne reflète pas ce qui se passe réellement chez l'homme. Néanmoins, ces méthodes permettent de contrôler les doses auxquelles les animaux sont exposés ainsi que l'interprétation des résultats d'études utilisant des méthodes d'exposition différentes.

La monographie du CIRC (Baan, 2007) rapporte deux études de cancérogenèse chez l'animal dont une implique l'utilisation des particules de TiO_2 sous forme micrométrique et l'autre des NPs de TiO_2 (Heinrich *et al.*, 1995). Dans cette dernière étude, des rats Wistar femelles ont été exposés par inhalation durant 24 mois à un mélange de NPs de TiO_2 anatase/rutile (80/20 ; 15-40 nm) à une concentration moyenne de 10 mg/m^3 , 18 heures/jour, 5 jours/semaine et sont restés 6 mois de plus dans un environnement ne contenant pas de TiO_2 . Après ces 24 mois d'exposition, quatre des neuf rats ont développé des tumeurs (dont deux carcinomes squameux cellulaires, un adénocarcinome et des tumeurs bénignes squameuses cellulaires). A trente mois (6 mois après la fin de l'exposition), une augmentation statistiquement significative d'adénocarcinomes a été observée. Par ailleurs, dans cette étude, des souris NMRI ont également été exposées treize mois et demi à 10 mg/m^3 , 18 heures/jour, 5 jours/semaine. Les résultats de cette étude ont montré une diminution significative de la durée de vie des souris. Néanmoins, aucune augmentation du nombre des tumeurs n'a été observée *versus* le groupe contrôle.

Il est à noter que des études de cancérogenèse sont présentées dans l'évaluation du CSSC (SCCP, 2000) mais que la taille des particules n'est pas précisée, de même qu'il n'est pas précisé si ce sont des particules de TiO_2 de taille « conventionnelle » ou sous forme nanoparticulaire.

Concernant les données chez l'homme, la monographie du CIRC (Baan, 2007) fait état de quatre études chez des professionnels travaillant dans la production de particules de TiO_2 et les conclusions de ces études aboutissent à l'absence d'association entre exposition aux particules de TiO_2 et augmentation de cancers du poumon. Néanmoins, ces études ne permettent pas de conclure du fait de l'absence de nombreuses informations notamment la taille des particules auxquelles les travailleurs sont exposés.

Concernant les NPs de ZnO , il n'existe pas à notre connaissance d'étude de cancérogenèse disponible.

Au vu du faible nombre d'études de cancérogenèse, des études de toxicité répétée ont été intégrées à ce rapport. Bien que ces études ne puissent pas se substituer à des études de cancérogenèse, elles permettent néanmoins de caractériser des mécanismes de toxicité. Ainsi, ces études sont présentées dans le paragraphe suivant.

6.1. Conclusions sur les études de cancérogenèse

La nécessité de réaliser des études de cancérogenèse mettant en jeu des NPs de TiO_2 et de ZnO , est indéniable afin de s'assurer de l'absence du risque cancérogène par voie cutanée comme par voie respiratoire. En effet, à ce jour, les données présentes dans la littérature scientifique ne permettent pas de conclure à des effets cancérogènes avérés que ce soit au niveau cutané ou pulmonaire.

Néanmoins, le CIRC a classé le TiO_2 en classe 2B, comme possiblement cancérogène, au regard des données par voie respiratoire montrant des effets toxiques pulmonaires chez le rat. Par ailleurs, le NIOSH (« *National Institute for Occupational Safety and Health* », 2005) a fixé des limites d'exposition étant donné le potentiel risque cancérogène pulmonaire. Les recommandations du NIOSH (« *draft* »), proposent une limite d'exposition à $0,1 \text{ mg/m}^3$ pour les NPs de TiO_2 et $1,5 \text{ mg/m}^3$ pour les particules fines (taille inférieure à $2,5 \mu\text{m}$).

7. Etudes de toxicité répétée

7.1. Données mettant en jeu la voie respiratoire

Quelques études d'exposition sub-chronique et chronique sont présentes dans la monographie du CIRC (Baan, 2007) et la littérature scientifique. Ces études font appel principalement à la voie respiratoire comme voie d'exposition et les résultats montrent une saturation de la clairance pulmonaire, une inflammation chronique pulmonaire, des tumeurs pulmonaires chez le rat après une exposition prolongée et cela pour de fortes concentrations de NPs (Baan, 2007). La saturation de la clairance pulmonaire apparaît comme plus marquée pour les animaux exposés aux NPs de TiO_2 *versus* ceux exposés aux particules de TiO_2 sous sa forme « conventionnelle ». Les résultats des études chroniques et sub-chroniques mais également ceux des études de génotoxicité tendent à montrer que le développement de tumeurs pulmonaires *via* l'exposition aux particules de TiO_2 par voie respiratoire serait dû à un mécanisme indirect de génotoxicité impliquant une inflammation chronique, une prolifération cellulaire et l'induction d'un stress oxydant (Kuempel *et al.*, 2009).

Par ailleurs, Baan (2007) précise que chez le rat, la saturation de la clairance pulmonaire est accompagnée d'une inflammation pulmonaire chronique, de la production d'espèces réactives de l'oxygène, d'une diminution des mécanismes de défense (antioxydants), d'une altération des cellules, d'une prolifération cellulaire, d'une fibrose et d'induction de mutations et éventuellement de cancers pulmonaires.

Enfin, la revue de Kuempel *et al.* (2009) qui consiste à une mise à jour de la monographie 93 du CIRC, met en exergue les récentes études par voie respiratoire montrant des effets toxiques pulmonaires. En conclusion, Kuempel *et al.* (2009) recommandent la réalisation d'études :

- épidémiologiques chez les professionnels travaillant dans la production de NPs de TiO_2 , les données d'exposition devant intégrer des informations sur la taille des particules, la structure cristalline et les propriétés de surface des particules ;
- de toxicologie chroniques par voie respiratoire utilisant les mêmes espèces animales afin de comparer les résultats et déterminer leur pertinence ;
- de cancérogenèse par voie topique.

Il est à noter que le NTP (« *National Toxicology Program* »), a mis en place un projet d'évaluation de la sécurité des nanomatériaux⁸. Ce projet prend en compte l'évaluation de la sécurité des NPs de TiO_2 et de ZnO en raison de leur utilisation dans les produits cosmétiques et notamment d'évaluer :

- la caractérisation de la taille, de la cristallinité et l'enrobage de ces NPs provenant de produits de protection solaire commercialisés ;
- la photoactivation du TiO_2 *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* ;
- la pénétration cutanée *in vitro* et *in vivo* ;
- la phototoxicologie du TiO_2 chez la souris et ;
- la photocancérogenèse du TiO_2 chez la souris.

Ainsi, il n'est pas possible de conclure quant aux effets cancérogènes pulmonaires par rapport aux données actuelles. Néanmoins, les données des études subchroniques et chroniques montrent des effets pulmonaires après exposition aux NPs de TiO_2 dans des conditions spécifiques. En revanche, ces données ne sont pas représentatives des NPs utilisées dans les produits cosmétiques car elles ne prennent pas en compte l'enrobage et/ou le dopage des particules.

7.2. Données mettant en jeu la voie cutanée

Il existe deux études d'absorption cutanée *in vivo* chez l'animal, se déroulant sur quelques semaines dont les protocoles et les résultats ont été présentés précédemment (Wu *et al.*, 2009 et de Sadrieh *et al.*, 2010). Ne seront présentés dans ce paragraphe que les effets cutanés observés.

Dans l'étude de Wu *et al.* (2009), des NPs de TiO_2 sont appliquées sur le porc au niveau des oreilles pendant 30 jours. Dans cette étude, des souris imberbes (BALB/c « *hairless* ») sont également exposées à des NPs de TiO_2 sur un site d'application de 3 cm^2 .

Chez le porc, des modifications histo-pathologiques des structures de la peau sont observées (modification de structures cellulaires, de l'espace intercellulaire, de desmosomes). Aucun signe clinique n'est observé chez les animaux, ni aucun érythème ou œdème.

⁸ National Toxicology Program (dernière mise à jour, 02 avril 2009). En ligne : <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=303069A0-F1F6-975E-72D33ECBD3E11363>

Après application pendant 60 jours, les souris exposées à des particules de TiO₂ présentent :

- un gain de poids inférieur à celui des souris contrôle, ou traitées par des particules de taille qualifiée de « normale » par les auteurs ou de 60 nm (différences statistiquement significatives par rapport au contrôle pour les tailles 10, 25 nm et P25) ;
- des différences de poids relatives du foie et de la rate (les coefficients augmentant pour les groupes d'animaux traités avec tailles 10, 25 nm et P25) ;
- une tendance à la baisse de l'activité de la SOD (superoxyde dismutase) dans la peau et le foie aux tailles 10 et 25 nm ;
- une augmentation de la lipoperoxydation dans la peau et le foie, variant en fonction de la taille des particules (les particules P25 ayant un effet plus marqué que les particules de 25 nm de rutile) ;
- une baisse d'hydroxyproline (HYP), variant avec la taille des particules (les particules P25 ayant un effet plus marqué que les particules de 25 nm de rutile).

Il est à noter que le contenu en HYP est directement proportionnel au contenu en collagène. Ainsi, la baisse en HYP et donc en collagène signe la présence d'un mécanisme de vieillissement accéléré.

Des modifications histopathologiques sont également observées dans certains de ces organes :

- peau : l'exposition aux nanoparticules provoquerait une kératinisation de la peau et une diminution de l'épaisseur de l'épiderme et du derme, accompagnée d'une accentuation des rides ;
- foie : un gonflement des canaux biliaires est observé à proximité d'une accumulation de particules et des zones de nécrose sont visibles ;
- cœur : une infiltration de globules blancs n'est observée qu'avec les particules de 10 nm ;
- rate et poumons : des modifications mineures, de type prolifération de macrophages et faible épaisseur alvéolaire, sont notées.

Dans le cerveau, aucune lésion histopathologique n'est mise en évidence.

Les résultats de cette étude ne sont pas extrapolables à l'homme, le protocole de cette étude présentant de nombreux biais méthodologiques. Par ailleurs, la souris imberbe correspond à une espèce dont la peau en termes de perméabilité et de structure reste plus éloignée de l'homme par rapport à une espèce telle que le porc. En effet, les souris imberbes présentent des follicules pileux anormaux et le contenu lipidique du *stratum corneum* est plus riche que celui de l'homme, ce qui explique probablement pourquoi certaines substances sont susceptibles de pénétrer et donc d'endommager la peau de souris (Sadrieh *et al.*, 2010).

Enfin, les formulations contenant les NPs de TiO₂ utilisées dans cette étude ne sont pas représentatives des formulations commercialisées, ce qui ajoute une difficulté supplémentaire à l'extrapolation des résultats à l'homme.

L'étude de Sadrieh *et al.* (2010) est effectuée sur des porcs Yucatan. Les porcs sont exposés à des formulations proches de celles commercialisées sur une période de 22 jours. Les résultats indiquent l'absence de lésions histopathologiques sur la peau. Par ailleurs, aucun signe irritatif, type érythème, n'est observé par les auteurs. Cette étude semble plus pertinente que celle de Wu *et al.* (2009) en particulier par rapport à l'espèce animale choisie qui reste la plus proche de l'homme en termes de perméabilité.

Néanmoins, ces études ne constituent pas des études de toxicologie chronique ni de cancérogenèse mais des études d'absorption cutanée avec une attention particulière sur des paramètres d'intérêt. Les durées utilisées dans ces études (22 et 60 jours) ne permettent pas de conclure quant aux effets cutanés potentiellement provoqués par des NPs de TiO₂ sur des expositions prolongées et avec des applications répétées.

7.3. Conclusions sur les études de toxicité répétée

Ces études ne correspondent certes pas à des études de cancérogenèse, mais apportent des informations sur les effets toxiques des NPs de TiO₂ après administration répétée. Ces études sont donc d'ordre mécanistique. Elles montrent ainsi des effets pulmonaires toxiques chez le rat après administration répétée. Toutefois, ces études ne permettent pas de conclure quant aux effets pulmonaires après exposition aux produits cosmétiques puisque les nanomatériaux utilisés dans ces études ne correspondent à ceux utilisés dans les produits cosmétiques.

8. Discussion, conclusions et recommandations

8.1. Discussion et conclusions

Ce rapport concerne l'état des connaissances relatif aux nanoparticules (NPs) de dioxyde de titane (TiO₂) et d'oxyde de zinc (ZnO) en termes de pénétration cutanée, de génotoxicité et de cancérogenèse. Ainsi, dans ce contexte, une revue des études disponibles a été réalisée.

Les résultats du grand nombre d'études de pénétration cutanée *in vitro* sur peau animale et *ex vivo* humaine, présentées dans le présent rapport indiquent une présence des NPs de TiO₂ dans les couches supérieures de la peau (*stratum corneum* et *infundibulum pilosébacé*).

In vivo chez l'animal, deux études d'absorption cutanée ont été réalisées avec des NPs de TiO₂ sur une période de 60 jours et de 4 semaines (Wu *et al.*, 2009 ; Sadrieh *et al.*, 2010). L'étude de Wu *et al.* (2009) n'a pas été jugée pertinente en raison des nombreux biais méthodologiques et du choix de l'espèce étudiée (la souris imberbe ou « *hairless* ») qui présente de grandes différences vis-à-vis de la peau de l'homme, en termes de perméabilité et de structure cutanées.

Wu *et al.* (2009) ont montré une pénétration cutanée limitée *in vivo* (pas d'atteinte du derme) de NPs de TiO₂ sur des oreilles de porc après 30 jours d'application. Cependant, Wu *et al.* (2009) montrent la pénétration cutanée de NPs de TiO₂ chez la souris BALB/c imberbe, associée à la présence de modifications histopathologiques au niveau de la peau et de lésions au sein de multiples organes. Néanmoins, comme le soulignent Sadrieh *et al.* (2010), la pertinence de ces résultats reste à démontrer. En effet, les souris imberbes présentent des follicules pileux anormaux et par ailleurs, le contenu lipidique du *stratum corneum* des souris est plus riche que celui de l'homme, ce qui explique probablement en partie pourquoi certaines substances sont susceptibles de pénétrer différemment la peau de ces souris par rapport à la peau de l'homme.

De ce fait, l'étude de la FDA (Sadrieh *et al.* 2010), demeure à ce jour l'investigation la plus pertinente concernant l'étude de la pénétration cutanée des NPs de TiO₂, notamment en raison du modèle animal choisi. Ainsi, cette étude est effectuée chez le mini-porc dont la peau constitue un modèle approprié pour l'extrapolation des résultats à l'homme (similarités liées à la perméabilité et à la structure cutanées). Par ailleurs, dans cette étude, des formulations contenant des NPs de TiO₂ proches de celles commercialisées dans les produits cosmétiques ont été utilisées, ce qui conforte la pertinence de cette étude. Néanmoins, il est à noter que les formulations testées dans cette étude contiennent environ 5 % de TiO₂ alors qu'il peut exister des formulations pouvant atteindre 25 % de TiO₂ (concentration maximale admise par la directive cosmétique).

Dans cette étude *in vivo* sur des mini-porcs traités 4 fois par jour, 5 jours par semaine durant 22 jours (Sadrieh *et al.*, 2010), les auteurs concluent à une présence de NPs de TiO₂ (enrobées et non enrobées) et de particules de TiO₂ submicroniques (300-500 nm) dans le *stratum corneum* et à la présence de quelques particules isolées de TiO₂ dans le derme pour les animaux traités avec les trois types de particules. Par ailleurs, cette étude révèle des quantités statistiquement significatives de TiO₂ dans le ganglion inguinal gauche du groupe traité par des NPs de TiO₂ non enrobées et dans le ganglion inguinal droit du groupe traité par des particules de TiO₂ submicroniques (300-500 nm) *versus* le groupe témoin négatif. Néanmoins, les auteurs combinent les résultats rapportés pour tous les types de ganglions étudiés (inguinaux, pré-capsulaires et sub-mandibulaires) et aucune différence statistiquement significative de tous les groupes traités *versus* le groupé témoin n'est notée.

Ces résultats ne permettent pas de conclure de façon définitive à une absence de pénétration cutanée *in vivo* chez le mini-porc du fait de la présence de NPs de TiO₂ non enrobées et de particules de TiO₂ submicroniques (300-500 nm) dans les ganglions inguinaux. Il conviendrait donc de quantifier la quantité disponible dans les ganglions inguinaux et de clarifier les mécanismes de pénétration. Il est toutefois à noter, comme le soulignent les auteurs, que les formulations utilisées dans cette étude contiennent 5 % de particules de TiO₂ or comme le soulignent à juste titre les auteurs, la concentration en TiO₂ admise dans les filtres UV est de 25 % dans les produits de protection solaire.

Concernant les NPs de ZnO, peu d'études sont disponibles comparativement à celles disponibles pour les NPs de TiO₂. Quelques études d'absorption cutanée *in vitro* (modèle de peau animale et humaine) et *in vivo* chez des volontaires ont été effectuées montrant la présence des NPs de ZnO dans les couches supérieures de la peau. Néanmoins, malgré les nombreux biais méthodologiques relevés, l'étude récente de Gulson *et al.*, (2010) conclut à une augmentation statistiquement significative du taux de ⁶⁸Zn détecté dans le sang et les urines chez les volontaires

traités par des NPs de ZnO. Toutefois, cette augmentation reste faible au regard des taux en zinc présents normalement chez l'homme, d'après les auteurs. On peut ajouter que les auteurs n'ont pas pu déterminer si le ^{68}Zn a été absorbé sous la forme de particules de ZnO ou sous la forme d'ions Zn^{2+} solubles ou sous ces deux formes. En conclusion sur la base des données disponibles, il n'est pas possible de conclure à une absence de pénétration cutanée des NPs de ZnO.

Il est important de noter que le ZnO n'est pas inclus à l'annexe VII, partie 1 de la directive cosmétique 76/768/CEE définissant la liste des filtres ultra-violets (UV) pouvant être utilisés dans les produits cosmétiques. Or l'article 4 de la directive cosmétique précitée, point g), précise que les produits cosmétiques ne peuvent pas contenir les filtres ultra-violets autres que ceux énumérés dans la première partie de l'annexe VII.

Les conclusions du présent rapport sont valables pour les peaux saines et non pour les peaux lésées. En effet, les résultats rapportés dans la littérature concernant la peau lésée semblent contradictoires et il est probable que toute lésion de la peau de nature pathologique ou d'origine exogène puisse favoriser l'absorption des NPs. Par ailleurs, il a été observé dans quelques études impliquant des NPs autres que les NPs de TiO_2 et de ZnO (par exemple les quantum dots et les fullerènes), qu'il pouvait exister un impact des effets mécaniques (par exemple flexion de la peau) sur la pénétration cutanée, entraînant une augmentation de la pénétration cutanée se traduisant par la présence de particules dans les couches profondes de l'épiderme et dans le derme. Enfin, le devenir des NPs *via* le follicule pileux après application topique reste à déterminer et l'hypothèse d'une accumulation des NPs dans le follicule pileux ne peut être écartée à ce jour, en raison notamment des processus d'élimination (sébum et/ou repousse du poil) très longs.

Les études de génotoxicité montrent des résultats positifs avec des mécanismes d'action qui impliqueraient principalement la génération d'un stress oxydant produisant des espèces réactives de l'oxygène (ERO) capable d'endommager l'ADN en l'absence de lumière UV. Les mécanismes proposés dans la littérature seraient probablement communs aux différentes NPs. On peut ajouter que les NPs de TiO_2 présentent des propriétés photocatalytiques (propriétés susceptibles de générer un stress oxydant après exposition aux rayonnements ultra-violets) qui seraient aussi impliquées dans la génotoxicité des NPs de TiO_2 . Par ailleurs, des effets génotoxiques directs ont également été rapportés sans que le mécanisme d'action mis en jeu et la nature des produits de modification de l'ADN ainsi formés soient clairement explicités par les auteurs.

Les NPs de TiO_2 utilisées dans les produits cosmétiques sont enrobées par des substances organiques ou inorganiques et peuvent être également dopées, afin de diminuer les effets du stress oxydant. De plus, des systèmes antioxydants sont ajoutés dans les formulations. Par ailleurs, la forme anatase du TiO_2 étant considérée comme susceptible de produire plus de stress photo-oxydant, les produits cosmétiques ne contiennent généralement que le TiO_2 sous la forme rutilé ou d'un mélange anatase/rutilé. Toutefois, une étude a montré une réactivité plus importante pour le mélange anatase/rutilé par rapport aux formes anatase et rutilé seules (Van der Meulen *et al.*, 2007).

L'étude récente de Landsiedel *et al.* (2010) est intéressante puisque les NPs utilisées correspondent à des NPs commercialisées pour un usage cosmétique. Cette étude montre de génotoxicité négatifs pour les particules étudiées. Par ailleurs, à la différence de nombreux travaux issus de la littérature scientifique, les particules étudiées sont caractérisées précisément.

Il est à noter les difficultés de transposer les résultats obtenus dans la littérature avec différents types de NPs qui ne sont pas représentatives de celles pouvant se retrouver dans les formulations des produits cosmétiques commercialisés (produits de protection solaire par exemple). En effet, les études disponibles ne prennent pas en compte l'ensemble des paramètres suscités (forme cristalline, enrobage et/ou dopage, etc.) et pouvant être impliqués dans la modulation des réponses.

Au stade des connaissances actuelles, il n'est pas possible de conclure de manière générale sur le potentiel génotoxique des NPs de TiO_2 enrobées et/ou dopées utilisées dans le cas particulier des produits cosmétiques et il convient de disposer d'études appropriées au cas par cas.

Les études de cancérogenèse sont à ce jour limitées. Il faut toutefois signaler que des études sur les effets biologiques à long-terme ont été réalisées chez l'animal, en particulier par voie respiratoire (instillation intra-trachéale, intra-nasale ou plus rarement exposition par inhalation). Ces études montrent une toxicité pulmonaire chez le rat, se manifestant par la saturation de la clairance pulmonaire accompagnée d'une inflammation pulmonaire chronique, de la production d'espèces réactives de l'oxygène, d'une diminution des mécanismes de défense (antioxydants), d'une altération

des cellules, d'une prolifération cellulaire et d'une fibrose. Toutefois, les effets observés ne peuvent être extrapolés à l'homme dans le domaine d'exposition aux produits cosmétiques. En effet, ces études utilisent principalement l'instillation intra-trachéale qui ne reflète pas l'exposition par voie aérienne mimant l'utilisation de « sprays » aérosol de protection solaire par exemple. De plus, les NPs de TiO₂ utilisées dans ces études ne sont pas représentatives des NPs de TiO₂ utilisées dans les produits cosmétiques.

La voie cutanée reste néanmoins la voie d'exposition majoritaire pour les produits cosmétiques de protection solaire par exemple. Toutefois, pour ces mêmes produits, l'utilisation de « sprays » aérosol est courante et il convient de considérer la voie aérienne comme une voie d'exposition possible.

En conclusion, les données disponibles ne permettent pas de conclure sur l'absence de potentiel cancérigène des nanoparticules dans les produits cosmétiques. Par conséquent, l'évaluation du risque doit tenir compte principalement de ces deux voies d'exposition possibles aux NPs à savoir les voies cutanée et aérienne.

8.2. Recommandations et perspectives

Le manque d'études pertinentes et représentatives des nanomatériaux réellement utilisés dans les produits cosmétiques ne permet pas de conclure sur l'innocuité de ces nanomatériaux dans les produits cosmétiques. Néanmoins, au vu des résultats disponibles :

- en se fondant sur l'étude de pénétration cutanée des NPs de TiO₂ de Sadrieh *et al.* (2010) effectuée *in vivo* sur des mini-porcs traités 4 fois par jour, 5 jours par semaine durant 22 jours, qui conclut à l'absence d'absorption cutanée significative, il convient de quantifier la quantité disponible dans les ganglions inguinaux, de clarifier les mécanismes de pénétration ainsi que l'impact sanitaire ;
- l'absorption cutanée et le franchissement de la barrière cutanée des NPs de ZnO ne peut pas être exclue ;
- la recherche doit continuer dans le domaine de la toxicologie des nanomatériaux utilisés dans les produits cosmétiques afin d'explorer les mécanismes de toxicité à long-terme, notamment sur des NPs enrobées et/ou dopées.

L'Afssaps est consciente des difficultés actuelles relatives à l'évaluation du risque lié à l'utilisation des nanomatériaux en raison des lacunes dans les connaissances scientifiques actuelles suivantes :

- le manque de données mécanistiques et toxicologiques permettant de caractériser le danger par voie cutanée ;
- l'absence de données toxicologiques permettant de caractériser le danger par voie respiratoire ; en absence de ces données, l'Afssaps recommande de ne pas utiliser les produits contenant ces nanomatériaux en « spray » ou en poudre autour du visage mais également quand les produits précités sont utilisés dans des locaux fermés ;
- l'absence de données fiables sur les nanomatériaux mis sur le marché dans le domaine des produits cosmétiques ;
- l'absence de protocoles de caractérisation et de détection validés à l'échelle internationale de ces nanomatériaux.

Toutefois, l'Afssaps estime nécessaire la réalisation d'études complémentaires :

- de pénétration cutanée mettant en jeu des NPs de ZnO et de TiO₂ de formules représentatives du marché des produits cosmétiques afin de confirmer les résultats retrouvés dans les autres études et apporter des explications sur les lacunes actuelles ;
- long terme par voies cutanée, orale et aérienne des NPs utilisées dans les produits cosmétiques (avec l'enrobage et/ou le dopage) ;
- de stabilité des NPs enrobées et/ou dopées utilisées dans le domaine cosmétique.

De plus, des études de pénétration cutanée sur peau lésée des NPs représentatives de celles utilisées dans les produits cosmétiques sont nécessaires afin d'évaluer le risque d'exposition systémique. En effet, la directive cosmétique 76/768/CEE précise à l'article 2, que les produits cosmétiques mis sur le marché à l'intérieur de la Communauté ne doivent pas nuire à la santé humaine lorsqu'ils sont appliqués dans les conditions normales ou raisonnablement prévisibles d'utilisation. Or, l'érythème solaire constituant une peau lésée, est représentatif d'un schéma

d'utilisation raisonnablement prévisible d'un produit de produit de protection solaire. En absence de ces informations, il convient de recommander de ne pas utiliser sur peau lésée les produits cosmétiques contenant les nanomatériaux de TiO_2 et de ZnO .

Par ailleurs, l'Afssaps estime que l'innocuité des nanomatériaux devra être évaluée au cas par cas dans les conditions d'utilisation des produits cosmétiques concernés.

La question de l'impact sur l'environnement, notamment dû au relargage des NPs de TiO_2 et de ZnO dans l'environnement associés à l'utilisation de produits cosmétiques et plus particulièrement des produits de protection solaire, a été prise en charge par l'Anses. Ainsi, dans son dernier rapport sur les nanomatériaux, l'Anses conclut que «pour l'environnement, le risque ne peut être estimé, il ne peut donc pas être exclu» (Afsset, 2010). Par ailleurs, il est précisé dans ce rapport que «concernant les crèmes solaires contenant du TiO_2 nanoparticulaire en général : il faut également préciser que, vis-à-vis de l'environnement, la quantité de NPs issues de crèmes solaires ne représente que 0,1 % de la totalité de la production nationale de TiO_2 ».

Bibliographie

Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset). (2010). Evaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et l'environnement. Saisine n°2008/005. Maisons-Alfort.

En ligne :

http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/460552230101468097041324565478/10_03_ED_Les_nanomatériaux_Rapport_comprime.pdf (dernière consultation le 07/06/2011)

Annales de Dermatologie et de Vénéréologie (2005). *Comprendre la peau* : Histologie et histophysiologie de la peau et ses annexes. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie 132 : 8S5-8S48.

Baan R.A., (2007). Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhalation Toxicology* 19 (Suppl 1), 213–228.

Barker P.J. et Branch A. (2008). The interaction of modern sunscreen formulations with surface coatings. *Progress in Organics Coatings* 62: 313-320.

Bermudez E., Mangum J.B., Wong B.A., Asgharian B., Hext P.M. Wahreit D.B. *et al.* (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicological Sciences* 77: 347-357.

Buchalska M., Kras G., Oszejca M., Lasocha W., Macyk W. (2010). Singlet oxygen generation in the presence of titanium dioxide materials used as sunscreens in suntan lotions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 213: 158-163.

Chaudhuri R.K., Majewski G. (1998). Amphiphilic microfine titanium dioxide: Its properties and application in sunscreen formulations. *Drug Cosmetic Industry* 162: 24-31.

Commission européenne. (2008). Follow-up to the 6th Meeting of the REACH Competent Authorities for the implementation of Regulation (EC) 1907/2006 (REACH).

En ligne : <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/pdf/nanomaterials.pdf> (dernière consultation le 07/06/2011)

Cross S.E., Innes B., Roberts M.S., Tsuzuki T., Robertson T.A., McCormick P. (2007). Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacology Physiology* 20: 148-154.

Dechsakulthorn F., Hayes A., Bakand S., Joeng L., Winder C. (2007). *In vitro* cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts. *AATEX 14, Special Issues*, 397-400.

Dufour E.K., Kumaravel T., Nohynek G.J., Kirkland D., Toutain H. (2006). Clastogenicity, photoclastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research* 607:215–224.

European Food Safety Authority (EFSA). (2011). DRAFT SCIENTIFIC OPINION. Guidance on risk assessment of nanoscience and nanotechnologies to food and feed.

En ligne : <http://www.efsa.europa.eu/fr/consultationsclosed/call/scaf110114.pdf> (dernière consultation le 07/06/2011)

Fenoglio I., Greco G. Livraghi S., Fubini B. (2009). Non-UV-induced radical reactions at the surface of TiO₂ nanoparticles that may trigger toxic responses. *Chemistry* 15: 4614-4621.

Filipe P., Silva J.N., Silva R., Cirne de Castro J.L., Marques Gomes M., Alves L.C. *et al.* (2009). *Stratum corneum* is an effective barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. *Skin Pharmacology Physiology* 22: 266-275.

Gohin M. (2009). Films photocatalytiques par voie sol-gel pour applications vitrages en intérieur. Thèse de doctorat de l'école polytechnique. Spécialité : science de matériaux.
En ligne : http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/50/13/50/PDF/These_Morgan_Gohin.pdf (dernière consultation le 07/06/2011)

Gulson B., McCall M., Korsch M., Gomez L., Casey P., Yalchin O. *et al.* (2010). Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. *Toxicological Sciences* 118: 140-149.

Gurr J.R., Wang A.S., Chen C.H., Jan K.Y. (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213: 66–73.

Heinrich U., Fuhst R., Rittinghausen S., Creutzenberg O., Bellmann B., Koch, W. *et al.* (1995). Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhalation Toxicology* 7: 533-556.

Hussain S., Boland S., Baeza-Squiban A., Hamel R., Thomassen L.C., Martens J.A. (2009). Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology* 260: 142-149.

International Cooperation on Cosmetic Regulation (ICCR). (2010). Rapport du groupe de travail *ad hoc* mixte de l'ICCR sur la nanotechnologie et les produits cosmétiques : critères et méthodes de détection – ICCR-4.
En ligne : http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/person/cosmet/info-ind-prof/iccr-4_2010-fra.php (dernière consultation le 07/06/2011)

Jiang J., Oberdörster, Elder, Gelein R., Mercer P., Biswas P. (2008). Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase ? *Nanotoxicology* 2: 33-42.

Joint Research Centre (JRC)-European Commission (2010). JRC Reference Reports : Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. EUR24403EN.
En ligne : http://ec.europa.eu/dgs/jrc/downloads/jrc_reference_report_201007_nanomaterials.pdf (dernière consultation le 07/06/2011)

Jonaitis T.S., Card J.W., Magnuson B. (2010). Letter to the Editor. *Toxicology Letters* 192: 268-269.

Kang S.J., Kim B.M., Lee Y.J., Chung H.W. (2008). Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environment Molecular Mutagenesis* 49: 399-405.

Karlsson H.L., Cronholm P., Gustafsson J., Moller L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology* 21: 1726-1732.

Kertesz Zs., Szikszai Z., Gontier E., Moretto P., Surlève-Bazeille J.-E., Kiss B. *et al.* (2005). Nuclear microprobe study of TiO₂-penetration in the epidermis of human skin xenografts. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 231: 280–285.

Kuempel E.D., Ruder A. (2009). Titanium dioxide (TiO₂), citation for most recent IARC review.
En ligne : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-4.pdf> (dernière consultation le 07/06/2011)

Kuo T.R., Wu C.L., Hsueh C.T., Lo W., Chiang S.J., Lin S.J. *et al.* (2009). Chemical enhancer induced changes in the mechanisms of transdermal delivery of zinc oxide nanoparticles. *Biomaterials* 30: 3002-3008.

Lademann J., Weigmann H., Rickmeyer C., Barthelmes H., Schaefer H., Mueller G *et al.* (1999). Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacology Applied Skin Physiology* 12: 247-256.

Lademann J., Richter H., Schanzer S., Knorr F., Meinke M., Sterry W., Patzelt A. (2010). Penetration and storage of particles in human skin: perspectives and safety aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 77: 465-468.

Landsiedel R., Lan M.H., Van Ravenzwaay B., Schulz M., Wiench K., Champ S. *et al.* (2010). Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. *Nanotoxicology* 4: 364-381.

Lekki J., Stachura Z., Dabros W., Stachura J., Menzel F., Reinert T. *et al.* (2007). On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: ion microscopy and autoradiography studies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 260: 174-177.

Li N., Ma L., Wang J., Zheng L., Liu J., Duan Y. *et al.* (2010). Interaction between nano-anatase TiO₂ and liver DNA from mice *in vivo*. *Nanoscale Research Letter* 5: 108-115.

Liu S., Xu L., Zhang T., Ren G., Yang Z. (2010). Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology* 267: 172-177.

Menzel F., Reinert T., Vogt J., Butz T. (2004). Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO₂ particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 219-220: 82-86.

National institute for occupational safety and health (NIOSH). (2005). NIOSH current intelligence bulletin: Evaluation of health hazard and recommendations for occupational exposure to titanium dioxide.

En ligne en 2007: <http://www.cdc.gov/niosh/review/public/tio2/pdfs/TIO2Draft.pdf>. (dernière consultation le 07/06/2011)

Newman M.D., Stotland M., Ellis J.I. (2009). The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. *Journal of American Academy of Dermatology* 61: 685-692.

Park E.J., Yi J., Chung K.H., Ryu D.Y., Choi J., Park K. (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicological Letters* 180: 222-9.

Pflücker F., Hohenberg H., Hölzle E., Will T., Pfeiffer S., Wepf R. *et al.* (1999). The Outermost stratum corneum layer is an effective barrier against dermal uptake of topically applied micronized dioxide. *Journal of Cosmetic Science* 21: 399-411.

Pflücker F., Wendel V., Hohenberg H., Gartner E., Will T., Pfeiffer S. *et al.* (2001). The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacology Applied Skin Physiology* 14 Suppl 1: 92-97.

Pinheiro J.P., Alves L.C., Verissimo A., Filipe P., Silva J.N., Silva R. (2007). The influence of corneocyte structure on the interpretation of permeation profiles of nanoparticles across skin. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B Beam Interactions with Materials and Atoms* 260: 119-123 T.

Popov A. (2008). TiO₂ as UV protector in skin. Faculty of technology, Department of electrical and information engineering. University of Oulu (Finland).

En ligne : <http://herkules.oulu.fi/isbn9789514288982/isbn9789514288982.pdf> (dernière consultation le 07/06/2011)

Rahman Q., Lohani M., Dopp E., Pemsel H., Jonas L., Weiss D.G. *et al.* (2002). Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in syrian hamster embryo fibroblasts. *Environmental Health Perspectives* 110: 797-800.

Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J.F., Jha A.N. (2008). Hydroxyl radicals (·OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research* 640: 113-122.

Rouse J.G., Yang J., Ryman-Rasmussen J.P., Baron A.R., Monteiro-Riviere N.A. (2007). Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano Letter* 7: 155-60.

Sadrieh N., Wokovich A.M., Gopee N.V., Zheng J., Haines D., Parmitter D. *et al.* (2010). Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicological Sciences* 115: 156-66.

Sayes C.M., Wahi R., Kurian P.A., Liu Y., West J.L., Ausman K.D. *et al.* (2006). Correlating nanoscale titanium structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological Sciences* 92: 174-185.

Schulz J., Hohenberg H., Pflücker F., Gartner E., Will T., Pfeiffer S. *et al.* (2002) Distribution of sunscreens on skin. *Advanced Drug Delivery Review* 54 Suppl 1: S157-163.

Scientific committee on consumer product (SCCP). (2007). Opinion on safety of nanomaterials in cosmetic products. SCCP/1147/07.

En ligne : http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_123.pdf (dernière consultation le 07/06/2011)

Scientific committee on consumer product (SCCP). (2009). Clarification on Opinion SCCNFP/0932/05 on Zinc oxide. SCCP/1215/09.

En ligne : http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_167.pdf (dernière consultation le 07/06/2011)

Scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers (SCCNFP) (2000). Opinion of the scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers concerning titanium dioxide. SCCNFP/0005/98.

En ligne : http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out135_en.pdf (dernière consultation le 07/06/2011)

Scientific committee on emerging and newly identified health risks (SCENIHR). (2009). Risk assessments of products of nanotechnologies.

En ligne : http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_023.pdf (dernière consultation le 07/06/2011)

Scientific committee on emerging and newly identified health risks (SCENIHR). (2010). Scientific basis for the definition of the term "nanomaterial".

En ligne : http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_030.pdf (dernière consultation le 07/06/2011)

Senzui M., Tamura T., Miura K., Ikarashi Y., Watanabe Y., Fujii M. (2010). Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin *in vitro*. *The Journal of Toxicological Sciences* 35: 107-113.

Sharma V., Shukla R.K., Saxena N., Parmar D., Das M., Dhawan A. (2009). DNA damaging potential of zinc oxide in human epidermal cells. *Toxicology Letters* 185: 211-218.

Shukla R.K., Sharma V., Pandey A.K., Singh S., Sultana S., Dhawan A. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in vitro* 25: 231-241.

Singh N., Manshian B., Jenkins G.J.S., Griffiths S.M., Williams P.M., Maffei T.G.G. *et al.* (2009). Nanogenotoxicology : the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30: 3891-3914.

Szikszai Z., Kertész Zs., Bodnar E., Major I., Borbiri I., Kiss A.Z. *et al.* (2010). Nuclear microprobe investigation of penetration of ultrafine zinc oxide into intact and tape-stripped human skin. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 268: 2160-2163.

Tan M.H., Commens C.A., Burnett L., Snitch P.J. (1996). A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *Australasian Journal Dermatology* 37: 185-187.

Theogaraj E., Riley S., Hughes L., Maier M., Kirkland D. (2007). An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles. *Mutation Research* 634: 205-19.

Therapeutic Good Administration (TGA). (2006). A review of the scientific literature on the safety of nanoparticulate titanium dioxide or zinc oxide in sunscreens.

En ligne : <http://www.tga.gov.au/npmeds/sunscreen-zotd.pdf> (dernière consultation le 07/06/2011)

Tiano L., Armeni T., Venditti E., Barucca G., Mincarelli L., Damiani E. (2010). Modified TiO₂ particles differentially affect human skin fibroblasts exposed to UVA light. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 408-415.

Tinkle S.S., Antonini J.M., Rich B.A., Roberts J.R., Salmen R., Depree K. *et al.* (2003). Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environmental Health Perspectives*; 111: 1202-1208.

Tran D.T., Salmon R. (2010). Potential photocarcinogenic effects of nanoparticle sunscreens. *Australasian Journal of Dermatology* 52: 1-6.

Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P., Schiestl R.H. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. *Cancer Research* 69: 8784-8789.

U.S. EPA. (2009). Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide (External Review Draft). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-09/057. En ligne depuis décembre 2010 : <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=230972> (dernière consultation le 07/06/2011)

Van der Meulen T., Mattson A., Osterlünd L. (2007). A comparative study of the photocatalytic oxidation of propane on anatase, rutile, and mixed-phase anatase–rutile TiO₂ nanoparticles: role of surface intermediates. *Journal of Catalysis* 251: 131-144.

Virgilio A.L., Reigosa M., Arnal P.M., Fernandez Lorenzo de Mele M. (2010). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of Hazardous Materials* 177: 711-718.

Wang J.J., Sanderson B., Wang H. (2007). Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation Research* 628: 99-106.

Wu J., Liu W., Xue C., Zhou S., Lan F., Bi L. *et al.* (2009). Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicological Letters* 191: 1-8.

Yanagisawa R., Takano H., Inoue K., Koike E., Kamachi T., Sadakane K. *et al.* (2009). Titanium dioxide nanoparticles aggravate atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood) 234: 314-322.

Zhang L.W., Monteiro-Riviere N.A. (2008). Assessment of quantum dot penetration into intact, tape-stripped, abraded and flexed rat skin. *Skin Pharmacology and Physiology* 21: 166-180.

Zvyagin A.V., Zhao X., Gierden A., Sanchez W., Ross J.A., Roberts M.S. (2008). Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin *in vitro* and *in vivo*. *Journal Biomedical Optics*, 13: 1-9.

Annexe 1 : Données de caractérisation et d'utilisations des nanomatériaux dans les produits cosmétiques fournies par les adhérents de FEBEA (d'après FEBEA, sondage réalisé en 2008)

Nanoparticules	Taille élémentaire (nm)	Produits et usages
Silice	12 à 60	- crèmes, émulsions, lotions, gels et huiles pour la peau - produits de protection solaire - produits destinés à être appliqués sur les lèvres - fonds de teint - parfums solides - produits de maquillage du visage et des yeux - exfoliants visage - dentifrices Ces produits sont destinés aux lèvres, aux yeux, aux muqueuses et peuvent être présentés sous forme de « sprays »
TiO ₂	21	- fonds de teint - crèmes, émulsions, lotions, gels et huiles pour la peau
Silice + TiO ₂	34	- fonds de teint
TiO ₂	15 à 90	- produits de protection solaire - crèmes, émulsions, lotions, gels et huiles pour la peau - fonds de teint - produits de maquillage du visage Ces produits peuvent être destinés aux lèvres. En ce qui concerne les produits de protection solaire, ils peuvent être sous forme de « sprays ».
ZnO	Non connue	- crèmes, émulsions, lotions, gels et huiles pour la peau, - produits de protection solaire Ces produits peuvent être destinés aux lèvres. En ce qui concerne les produits de protection solaire, ils peuvent être sous forme de « sprays ».
Ci 77226 Carbon black	Non connue	- mascaras - produits pour les yeux
Oxyde de fer CI 77491 CI 77492 CI 77499	10-30	- produits de maquillage des yeux - produits de protection solaire

Annexe 2 : Généralités sur la structure cutanée

La partie externe de la peau, au contact de l'air, est appelée couche cornée ou *stratum corneum*. L'épaisseur du *stratum corneum* varie entre 6 et 40 µm selon les données de la littérature (Popov, 2008) sur des zones telles que l'abdomen, l'avant-bras, la cuisse et le dos. Il est constitué de cornéocytes et les régions intercellulaires sont constituées de lipides. On comptabilise environ 15 couches constituant le *stratum corneum*. Une couche cellulaire se renouvelle toutes les 24 heures, ainsi la totalité du *stratum corneum* peut être renouvelée en deux semaines. Il est à noter que le *stratum corneum* correspond à la partie « morte » de l'épiderme.

Sous le *stratum corneum*, on retrouve l'épiderme viable dont l'épaisseur se situe aux alentours de 100 µm et qui est constitué de 10 à 20 couches cellulaires et contient des kératinocytes responsables de la synthèse du *stratum corneum*. On retrouve également dans l'épiderme viable des mélanocytes responsables de la pigmentation de la peau et des cellules de Langerhans impliquées dans la réponse immunitaire. L'épiderme viable est conventionnellement divisé en trois couches : *stratum basal*, *stratum spinosum* et *stratum granulosum*. Cette division est due aux différentes étapes de maturation des kératinocytes lors de leur migration vers la surface de la peau. La migration des kératinocytes dure entre deux et quatre semaines.

Sous l'épiderme viable, on retrouve le derme qui correspond à la couche la plus épaisse de la peau puisqu'il mesure environ 1200 µm. Le derme est constitué principalement de collagène qui assure l'élasticité et la résistance de la peau. On retrouve également d'autres cellules dans le derme telles que : les fibroblastes, les cellules endothéliales et les mastocytes ; les macrophages, les lymphocytes et les leucocytes peuvent pénétrer facilement le derme en cas d'inflammation. Enfin le derme est irrigué par des vaisseaux sanguins et permet les processus :

- d'échange de chaleur ;
- de réparation ;
- de réponses immunitaires et ;
- de régulation thermique.

Enfin, la dernière couche cellulaire correspond à l'hypoderme qui est situé sous le derme. Il est constitué d'adipocytes arrangés en lobules et est richement vascularisé. Cette couche permet le stockage de l'énergie et une protection vis-à-vis des chocs physiques et des variations de température.

On retrouve également le follicule pileux dans la peau. Les follicules pilo-sébacés comportent : le poil et ses gaines, le muscle arrecteur du poil et la glande sébacée. Par définition :

- l'isthme d'un follicule pileux est la zone où s'abouchent la ou les glandes sébacées ;
- le "*bulge*", zone particulièrement importante où sont situées les cellules souches du poil, est un renflement situé juste sous l'insertion du muscle arrecteur ;
- la région sus-isthmique comprend la tige pileuse telle qu'elle émerge à la surface de la peau et l'*infundibulum*, cavité en communication avec la surface de la peau, bordé par un épithélium en continuité avec l'épiderme de surface ;
- la région sous-isthmique comprend la racine du poil entourée de ses gaines : la gaine épithéliale externe et la gaine épithéliale interne (Annales de Dermatologie et de Vénéréologie, 2005).

La couche cornée ou *stratum corneum* (voire même « peau morte ») de la peau humaine constitue une barrière relativement efficace à la pénétration des substances chimiques. Les substances chimiques peuvent toutefois franchir cette barrière selon différents facteurs physico-chimiques propres à la substance et facteurs physiologiques propres à l'individu.