

Université de Montréal

**Analyse Systématique des Données sur le Control Banding et
Proposition d'une Méthode Semi-Quantitative Selon des Critères
Physico-Chimiques et Biologiques des Nanomatériaux Manufacturés**

Par

Kaotar Dimou

**Département de santé environnementale et santé au travail,
École de santé publique**

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M. SC.)
en Santé Environnementale et Santé au Travail
option recherche

Juillet 2019

© Kaotar Dimou, 2019

Résumé

Parmi les méthodologies d'appréciation du danger ayant connu une forte croissance ces dernières décennies figurent le Control Banding (CB). Selon une estimée du NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health), cette approche qualitative a été développée dans l'industrie pharmaceutique dans un but concret de protéger près de 90% de travailleurs n'ayant pas accès à des services de santé, de sécurité et d'hygiène au travail. Actuellement, cette approche peut être adaptée aux spécificités des nanomatériaux (NMs) pour lesquelles peu de connaissances scientifiques sont disponibles sur les risques potentiels pour la santé et pour la sécurité des travailleurs. Au cours des dernières années, différentes études ont porté sur l'application de l'approche CB et plusieurs pays ont développé leur propre méthode adaptée aux NMs. Par contre, tous les modèles développés sont basés sur des critères qualitatifs du danger et de l'exposition. Une approche semi-quantitative permettrait de mieux gérer les dangers liés à la manipulation des NMs. L'objectif de ce mémoire était de développer une approche semi-quantitative d'évaluation des dangers sur la base d'une approche de CB. Pour ce faire, une analyse systématique de la littérature scientifique des 20 dernières années sur l'approche de CB a été effectuée. Les bases de données Toxline, Pubmed et Google Scholar ont été consultées, couvrant la période de janvier 1996 à novembre 2016, en utilisant 4 mots-clés: control banding, nanomaterials, physicochemical, biological characteristics. Cette recherche a permis d'identifier 982 articles, dont 11% (91) furent retenus en première intention pour au final en garder 6% (51/982). Il ressort de cette revue que le CB est une approche complémentaire aux méthodes d'évaluation quantitative et que les outils CB développés pour les NMs sont tous de nature qualitative, en réponse à une exposition. Une approche semi-quantitative où il y a maillage entre la caractérisation biologique avec les tests *in vitro* et la caractérisation physicochimique par des analyses chimiques pour mieux caractériser le niveau de dangerosité des NMs tel que présenté dans le présent mémoire permettrait une utilisation plus judicieuse du CB. Cette approche novatrice du CB dépasse largement l'utilisation que l'on en fait actuellement en hygiène du travail, devrait accroître la confiance dans le jugement des experts en santé au travail, afin d'orienter les travailleurs et la population générale vers une utilisation sécuritaire des NMs.

Mots-clés: danger, NIOSH, Control Banding, nanomatériaux, physicochimiques,

caractéristiques biologiques, semi-quantitative.

Abstract

Among the hazards assessment methodology that has grown exponentially during the last decade, mention Control Banding (CB). According to the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), this qualitative approach originally developed in the pharmaceutical industry, aims to protect approximately 90% or 2.7 billion workers that do not have access to occupational safety, health, and hygiene. Currently, this approach can be adapted to the specificities of nanomaterials (NMs), considering the significant lack of scientific knowledge about their potential health and safety risks to workers. In recent years, several CB models have been developed, and many countries have created their own nano-specific CB instruments. However, a semi-quantitative approach would better managing the hazards of handling nanomaterials in the workplace. This thesis aimed to perform a systematic literature review over the past 20 years about the CB approach and then to suggest a semi-quantitative hazard assessment. The official Web pages of the databases Toxline, Pubmed and Google Scholar were used, covering the literature from January 1996 to November 2016, with use of the 4 keywords to locate relevant articles: Control Banding, nanomaterials, physico-chemical, biological characteristics. These searches yielded a total of 982 articles, 11% (91) were retained to eventually retain 6% (51/982). This review shows that the CB approach is an interesting and complementary methodology to quantitative evaluation methods and the CB tools developed for NMs are all qualitative in nature, in response to an exposure and adapted to different work environments. It is possible to make better use by proposing a semi-quantitative approach based on physicochemical and toxicity parameters of NMs to better characterize their degree of dangerousness. We propose here an original methodology proposing the interaction of *in vitro* tests and chemical analyzes. This innovative Control Banding approach should increase confidence in the judgment of experts and industry, as well as to guide both exposed workers and the uses of NMs in this industry.

Keywords: hazard, NIOSH, Control Banding, nanomaterials, physicochemical, biological characteristics, semi-quantitative.

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>ii</i>
<i>Table des matières</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des tableaux et des figures</i>	<i>v</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>vi</i>
<i>Remerciements</i>	<i>viii</i>
<i>Introduction générale</i>	<i>1</i>
CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
1. Développement des nanotechnologies et risques potentiels des nanomatériaux	5
1.1 Définitions officielles et réglementation	5
1.2 Classification des nanomatériaux	7
1.3 Sources d'émission des nanomatériaux	9
1.4 Applications	10
1.5 Évaluation du risque toxicologique des nanomataériaux	12
1.6 Nanotoxicologie: l'émergence d'une discipline	13
1.6.1 Propriétés uniques des nanomatériaux	14
1.6.2 Importance de la caractérisation en nanotoxicologie.....	15
1.6.3 Toxicité <i>in vivo et in vitro</i> des nanomatériaux	17
2. Approche du Control Banding (ou gestion graduée des risques)	19
2.1 Origines	19
2.2 Présentation de l'outil	20
2.3 Avantages et limites de l'approche Control Banding	22
2.4 Le CB appliqué aux NMs	24
2.5 Problématique et objectifs	25
CHAPITRE 2: LES ARTICLES SCIENTIFIQUES	27
<i>Article # 1 : Nanomaterials, and Occupational Health and Safety—A Literature Review About Control Banding and a Semi-Quantitative Method Proposed for Hazard Assessment.</i>	<i>28</i>
<i>Abstract</i>	<i>30</i>
1. Introduction	31

2. Methods	33
2.1 Literature Search Strategy	33
2.2 New Methodology Approach Based on CB, but for Health Hazard Characterisations of ENMs	34
3. Result and Discussion	35
3.1 Results from the Literature Search	35
3.2 Origins of the CB Strategy	35
3.3 CB Tools for ENMs	37
3.3.1 CB Nanotool (United States of America)	38
3.3.2 Precautionary Matrix (Switzerland)	39
3.3.3 ANSES CB Tool for ENMs (France)	40
3.3.4 NanoSafer (Denmark)	40
3.3.5 The Guidance (The Netherlands)	41
3.3.6 Stoffenmanager Nano (The Netherlands)	42
3.4 New Methodology Presented After the Literature Review	44
4. Conclusion	49
5. References	50
<i>Article # 2: Safety assessment of Engineered Nanomaterials (ENMs) using physicochemical properties an in vitro testing: A new approach methodology to improve the hazards assessment.</i>	53
<i>Abstract</i>	54
1. Introduction	55
2. Methods	57
3. Results	58
3.1 Data synthesis from the literature review	58
3.3.1 Effect of particle size and surface area on reactivity	59
3.3.2 Effect of particle shape on reactivity	61
3.3.3 Effect of nanomaterial surface on reactivity	62
3.3.4 Effect of nanomaterial chemical composition on reactivity	63
3.1.5 Effect of nanomaterial crystal structure on reactivity (crystallinity)	64
3.3.6 Effect of nanomaterial aggregation state	65
3.2 Selection Criteria of in vitro tests	65
3.3 Development of hazard matrix tool	67
4. Discussion	70
5. Conclusion	72
6. References	73
CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	78

Liste des tableaux et des figures

Tableau 1:Classification des nanoparticules en fonction de leur composition chimique....	9
Tableau 2:Domaines d'application par type de nanomatériaux.....	11
Tableau 3: Principales caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux pouvant influencer leur toxicité.....	16
Figure 1: Classification des nanomatériaux selon la norme ISO TS 80004-1.....	8
Figure 2:Nombre de produits de consommation basés sur la nanotechnologie disponible sur le marché.....	12
F Figure 3:Publications liées à la nanotoxicologie	14
Figure 4:Matrice des bandes de contrôle à mettre en place suite à la combinaison du niveau de danger et de l'estimation de l'exposition.....	22

Liste des abréviations

CB : Control Banding

VLEP : Valeurs Limites d'Exposition Professionnelles

NMs : Nanomatériaux Manufacturés

OECD : Organisation de Coopération et de Développement Économiques

ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists

WWICS: Woodrow Wilson International Center for Scholars

NIOSH : National Institute for Occupational Safety and Health

REACH: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals

PME : Petites et Moyennes Entreprises

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

BIT : Bureau International du Travail

IOHA : International Occupational Hygiene Association

SST : Santé et Sécurité au Travail

Mt : Million de tonnes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Claude Emond, pour avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire de recherche, et m'avoir permis ainsi d'entrer dans le monde de la recherche, et dans celui de la nanotechnologie. Je le remercie pour sa gentillesse et simplicité, pour ses précieux conseils, pour son aide dans mille et une petites questions pratiques ou discussions théoriques.

Je remercie également tous les membres du département Santé Environnementale et Santé au Travail et plus particulièrement l'ensemble des professeurs qui m'ont enseigné tout au long de ma maîtrise.

Je sais grée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal de m'avoir octroyé une bourse d'excellence d'études supérieures, qui m'a permis de poursuivre ma recherche dans des conditions idéales de calme et de sérénité.

Enfin, je voudrais remercier de tout cœur mon mari pour son précieux support tout au long de mon parcours, mes parents et mes sœurs qui malgré la grande distance qui nous sépare m'ont soutenu psychologiquement à chaque étape de ce travail.

Introduction générale

Dans l'ensemble des pays industrialisés, le domaine des nanosciences a connu un essor fulgurant depuis les années 2000. En effet, de nombreux indicateurs de développement économiques témoignent de la forte croissance du secteur des nanotechnologies au cours des 20 dernières années. Notamment les investissements publics et privés qui s'élèvent à une dizaine de milliards de dollars US; le très grand nombre d'entreprises qui comptent environ 5000 entreprises US actives dans ce secteur ; la recherche scientifique caractérisée par une rapide « montée en puissance », les effectifs du nombre de chercheurs impliqués dans le monde seraient passés de 2 millions en 2015 jusqu'à 6 millions en 2020; etc. L'avènement de l'infiniment petit à travers le développement des nanotechnologies est considéré aujourd'hui comme étant « la révolution industrielle» du XXIème siècle [1]. L'idée de manipuler les atomes et les molécules avait été auparavant soulevé par le physicien et récipiendaire du prix Nobel de physique Richard Feynman dans son célèbre discours « There is Plenty of Room at the Bottom », qu'il prononça au Californian Institute of Technology en 1959 [2]. Il y évoquait que la possibilité du développement des sciences à l'échelle nanométrique passerait par la mise au point d'outils perfectionnés capables de visualiser le nanomonde. Inventée au début des années 80, la microscopie à effet tunnel, suivie de la microscopie à force atomique, qui ont valu à leurs inventeurs, G. Binnig et H. Rohrer, le prix Nobel de physique en 1986, ont permis d'atteindre la vision de Feynman [3].

De nos jours, les nanosciences constituent un domaine de recherche multidisciplinaire où des variétés croissantes de nanomatériaux sont synthétisées [4]. Ces particules dont la taille se situe entre 1 et 100 nanomètre [5], possèdent des propriétés physico-chimiques uniques et attrayantes, leurs conférant d'importantes innovations scientifiques et techniques dans des domaines très variés tels que la médecine, l'aérospatiale, l'agriculture, le secteur militaire et du transport pour n'en nommer que quelques-uns [6]. Néanmoins, des études [7-9], montrent que ces paramètres physico-chimiques (Taille, composition chimique, caractéristiques morphologiques...) ont une grande influence sur l'activité biologique (réaction inflammatoire, stress oxydant, mort cellulaire, génotoxicité). Par conséquent, l'émergence rapide des nanotechnologies et l'exposition directe des êtres humains aux

nanomatériaux dans leur vie quotidienne via un nombre croissant de sources, suscite des craintes de la part des autorités de santé publique de plusieurs pays concernés par rapport à l'évaluation quantitative des risques sanitaires des nanomatériaux pour la santé et l'environnement [10].

Dans le cas particulier des nanomatériaux, l'évaluation quantitative des risques est d'autant plus difficile à réaliser en raison de l'absence de données toxicologiques, spécifiques aux nanomatériaux étudiés [11]. Ces importants manquements dans un domaine caractérisé par de hauts niveaux d'incertitudes pourrait influencer les modalités de mise en place de dispositifs publics de contrôle de nanotechnologies introduites sur un territoire donné et empêcher ainsi qu'une évaluation scientifique rigoureuse des risques soit réalisée. À l'heure actuelle, l'évaluation des risques potentiels des nanomatériaux restent principalement de nature qualitative [12]. Désignée par le terme anglo-saxon de « Control Banding (CB) », cette méthode d'évaluation qualitative développée au début des années 1980 dans l'industrie pharmaceutique a pour but de protéger des travailleurs exposés aux produits pharmaceutiques potentiellement dangereux ne disposant pas de valeurs limites d'exposition professionnelles (VLEP) ou encore de données concernant leur toxicité. Elle a par la suite été développé pour les produits chimiques et plus récemment aux nanomatériaux [13, 14]. Cette méthode par niveau de risque [15] consiste à associer les nouveaux produits chimiques pour lesquels peu de connaissances scientifiques sur la toxicité sont disponibles à une catégorie ou « bande » de risque principalement définie en fonction du niveau de danger des produits chimiques connus et similaires à ceux utilisés, tout en tenant compte de l'exposition. Chaque bande de risque correspondait à un niveau de contrôle [16, 17]. Au cours des dernières années, plusieurs études ont porté sur l'application du modèle de Control Banding (CB) adapté aux nanomatériaux, et plusieurs pays ont développé leur propre méthode. Cependant, aucun modèle CB n'a été jusqu'à présent été développé sur la base de la réactivité physico-chimique et biologique des nanomatériaux.

Ce mémoire est subdivisé en deux sections principales. Une revue de littérature portant sur les nanomatériaux et sur leurs risques potentiels sur la santé ainsi que sur l'approche de Control Banding. Suivent ensuite deux articles décrivant le cheminement de la démarche

proposée dans le cadre de ce mémoire. Enfin, une discussion générale portant sur les résultats et des perspectives de recherche sont présentée.

CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Développement des nanotechnologies et risques potentiels des nanomatériaux

1.1 Définitions officielles et réglementation

Le concept de « nanotechnologie » fut introduit pour la première fois par le physicien Richard Feynman en 1959 dans un exposé donné intitulé “There’s plenty of Room at the Bottom” [2] à l’Institut Américain des Technologies, sans formaliser une définition de ce nouveau champ de recherche. Le terme nanotechnologie (d’après le grec *νάνος* signifiant *nain*) fut utilisé pour la première fois 15 ans plus tard par le professeur japonais Norio Taniguchi pour désigner les nanotechnologies comme « l’ensemble des procédés de séparation, de consolidation et de déformation des matériaux atome par atome ou molécule par molécule » [18]. La définition suivante des nanotechnologies a été proposée en 2004 par la Royal Society and Royal Academy of Engineering [19] : « la conception, la caractérisation, la production et l’application de structures, dispositifs et systèmes par le contrôle de la forme et de la taille à une échelle nanométrique ». Selon la National Nanotechnology Initiative des États-Unis, la nanotechnologie, « *c’est la compréhension et le contrôle de la matière ayant des dimensions situées entre 1 et 100 nanomètres, dont les phénomènes uniques qui y sont associés, permettent de développer de nouvelles applications* » [5]. Plus de 30 ans après leur introduction sur le marché, il n'existe toujours pas de définition commune ou universellement acceptée des nanotechnologies. En effet, de nombreuses définitions des produits issus des nanotechnologies existent, cependant, aucun consensus international n’a encore été trouvé parmi les experts pour définir le terme nanomatériaux de manière uniforme [20]. Selon les documents techniques de la norme ISO/TS27687 et ISO/TS80004-1 [21, 22], un nanomatériau est « un matériau dont au moins une des dimensions externes est à l’échelle nanométrique ou qui possède une structure interne ou de surface à l’échelle nanométrique ». Le domaine de dimension nanométrique est compris entre 1 et 100 nm approximativement. Dans sa recommandation d’Octobre 2011 (2011/696/UE), la Commission Européenne définit officiellement un nanomatériau comme « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d’agrégat ou sous forme d’agglomérat, dont au moins 50% des particules dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm. ». La commission européenne avait prévu de présenter une révision de la définition des

nanomatériaux en décembre 2014 comme prescrit dans une recommandation initiale adoptée en 2011 mais la procédure est toujours en cours. Parmi les définitions posées figurent celles des termes de "particule", "agglomérat" et "agrégat", définis comme suit selon l'article 3 du règlement (CE) n° 1907/2006 [23],

a) on entend par "**particule**" un minuscule fragment de matière possédant des contours physiques bien définis ; b) on entend par "**agrégat**" une particule constituée de particules fortement liées ou fusionnées c) on entend par "**agglomérat**" un amas de particules ou d'agrégats faiblement liés dont la surface externe globale correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels.

La définition européenne des nanomatériaux est fondée exclusivement sur la taille, sans faire mention à des propriétés spécifiques. Une définition plus précise et plus spécifique des nanomatériaux s'impose au fur et à mesure que les études sur les effets biologiques des nanomatériaux avancent, une définition qui ne prendrait plus seulement en compte la taille des objets, mais également leurs propriétés physico-chimiques. Le critère de taille demeure aussi le premier et le principal élément de définition retenue notamment au Canada. Santé Canada a donné une définition provisoire des nanomatériaux:

Santé Canada estime que toute substance ou tout produit fabriqué constitue un nanomatériau [24] s'il;

- a) est à l'échelle nanométrique, ou dans les limites de celle-ci, dans au moins une dimension externe ou présente une structure interne ou en surface à l'échelle nanométrique, ou
- b) est plus petit ou plus grand que l'échelle nanométrique dans toutes les dimensions et affiche un ou plusieurs phénomènes ou propriétés à l'échelle nanométrique

Aux fins de la présente définition :

- i. le terme « à l'échelle nanométrique » signifie 1 à 100 nanomètres (nm) inclusivement,
- ii. le terme « propriétés ou phénomènes à l'échelle nanométrique » signifie des propriétés qui sont attribuables à la taille et à aux effets; ces propriétés sont faciles

- à distinguer des propriétés chimiques ou physiques des atomes, molécules et matériaux particuliers et les matériaux en vrac,
- iii. le terme « fabriqué » comprend les processus techniques et les contrôles de la matière.

Ces définitions sont aujourd'hui des outils utiles à la normalisation de la fabrication et de l'utilisation des nanomatériaux. À l'heure actuelle, il n'existe aucune réglementation internationale spécifiquement applicable aux nanotechnologies. Malgré les multiples efforts déployés par l'Union européenne en ce domaine et bien qu'elle ait adopté depuis les années 80 un nombre considérable de législations générales et sectorielles visant à protéger la santé des consommateurs et l'environnement, elle ne dispose à ce jour d'aucune réglementation spécifique qui régit l'utilisation des nanomatériaux [20, 25]. Néanmoins, la commission européenne a adopté le 3 décembre 2018 la révision de plusieurs annexes du règlement REACH pour la prise en compte des risques liés aux nanomatériaux. Les nouvelles dispositions entreront en vigueur en janvier 2020 [26]. Néanmoins, l'Europe reste le premier endroit au monde où l'étiquetage des nanomatériaux présents dans la liste des ingrédients cosmétiques [27] et les produits biocides [28] est obligatoire depuis 2013. En outre, un règlement concernant l'étiquetage de nanomatériaux dans les denrées alimentaires a été adopté par l'Europe en 2013 [29] et a été récemment mis à jour [30]. En 2011, le Canada et les États-Unis ont annoncé, la création d'un Conseil canado-américain de coopération en matière de réglementation de manière à faciliter le transit de marchandises de part et d'autre de la frontière et pour stimuler le commerce et la compétitivité en Amérique du Nord [24].

1.2 Classification des nanomatériaux

Il existe une grande diversité de nanomatériaux et leur nombre ne cesse de s'accroître. Ainsi, il faut prendre en considération que la classification des nanomatériaux n'est pas stabilisée et donc susceptible d'évoluer dans le temps. Selon Buzea, il existe plusieurs façons de regrouper les nanomatériaux en fonction des paramètres que sont la taille, la morphologie, la composition chimique, l'uniformité et l'état d'agrégation [8]. Toutefois, ici on se limitera à la classification des nanomatériaux selon la taille et la composition chimique qui sont les paramètres les plus fréquemment utilisés.

Conformément à la norme ISO/TS80004-1, Il existe deux grandes familles de nanomatériaux classées en fonction des dimensions, les **nano-objets** et les **matériaux nanostructurés** (figure 1). Les nano-objets se subdivisent en trois catégories [22] :

- 3 dimensions nanométriques : **nanoparticules** (p. ex : nanoparticule d'or)
- 2 dimensions nanométriques : **nanotubes** (p. ex : nanotubes de carbone)
- 1 dimension nanométrique : **nanofeuillets** (p. ex : feuillet de graphène)

Les matériaux nanostructurés, de plus grande taille, possèdent eux une structure interne ou de surface à des dimensions nanométriques. On en distingue les **agrégats et agglomérats de nano-objets** dont la taille est supérieure à 100 nm, les **nanocomposites**, composés de nano-objets qui sont incorporés dans une matrice ou sur une surface et les **matériaux nanoporeux**.

Les nanomatériaux à une, à deux ou à trois dimensions peuvent également être classés sur la base de leur composition chimique en quatre grands groupes : Matériaux à base de carbone - Matériaux à base de métaux – dendrimères - Matériaux composites [31, 32], (tableau 1)

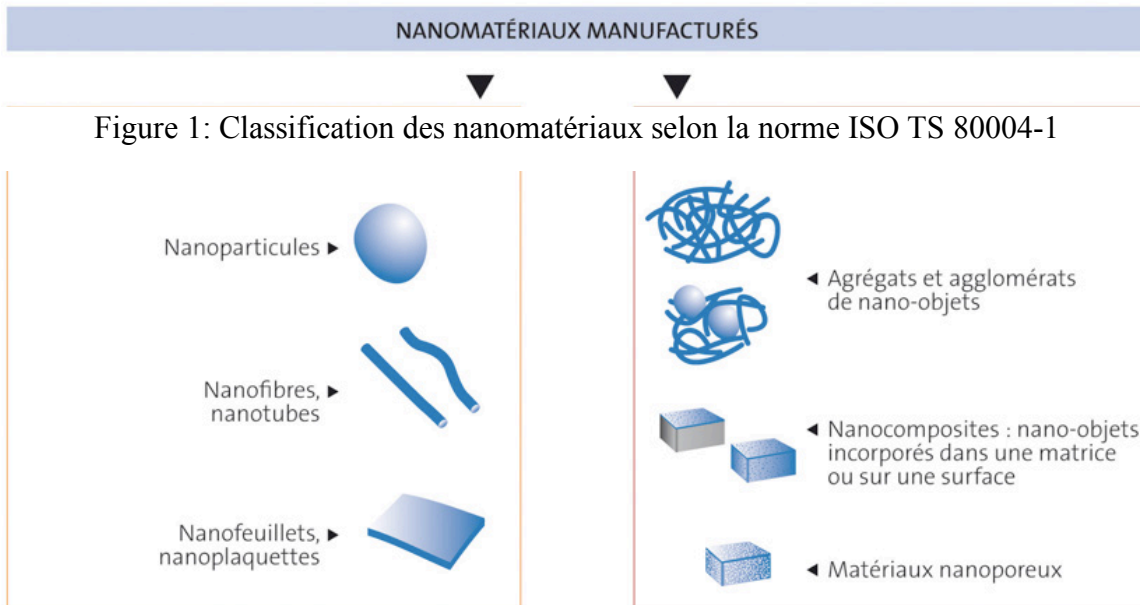


Tableau 1: Classification des nanoparticules en fonction de leur composition chimique

	Matériaux à base de carbone	Matériaux à base de métaux	Dendrimères	Matériaux composites
Définition	Matériaux à base de carbone qui ont soit une forme sphérique, ellipsoïdale ou tubulaire.	Matériaux à base inorganique, ayant un élément chimique métallique	Polymères assemblés de façon ramifiée et aux cavités intérieures vides.	Matériaux résultant d'une combinaison entre des nanoparticules et un autre matériau à la nano-échelle
Exemples d'application	-Fullerènes -Nanotubes de carbone à simple paroi -Nanotubes de carbone à parois multiples	-Points quantiques -Nanoparticules d'or/ d'argent -NP de type « oxyde-métal » (dioxyde de zinc ou cérium ou titane)	-On trouvera des dendrimères dont le nombre de générations varie en fonction des couches d'unités répétées. -Chaque dendrimère peut-être couplé à des molécules de surface lui donnant ainsi de nouvelles propriétés.	-NP de silice mésoporeuses jumelées à du Gadolinium ou Manganèse (pour application liée à imagerie à résonance magnétique). -NP de PLGA ((poly (dl-lactide-co-glycolide)) couplées à des agents thérapeutiques pour être utilisées dans le traitement contre le VIH.

Sources: [31-33]

1.3 Sources d'émission des nanomatériaux

Les nanoparticules sont des objets relativement fréquents et les sources de production peuvent être classées en trois catégories principales en fonction de leur origine :

- **Origine naturelle** : provenant principalement des phénomènes naturels tels que les éruptions volcaniques, les feux de forêts, l'érosion des sols, la condensation de gaz dans l'atmosphère... [8, 34, 35]
- **Origine anthropogénique (production humaine) non-intentionnelle** ou appelée aussi accidentelle : issue de la combustion des moteurs en particulier diesel, les rejets industrielles, les procédés métallurgiques
- **Origine anthropogénique intentionnelle** qui sont intentionnellement manufacturés par l'Homme sous forme de nanomatériaux [8, 35]. Ce sont sur les nanomatériaux manufacturés (NMs) que nous allons nous focaliser plus précisément dans ce mémoire.

Les NMs peuvent être produits par synthèse chimique (approche ascendante ou « bottom-up ») après condensation de vapeur ou cristallisation ou en brisant mécaniquement des matériaux de plus grande taille (approche descendante ou « top-bottom ») [36]

1.4 Applications

Le marché des nanotechnologies ne cesse de grandir depuis les années 90 entre autres à cause des propriétés uniques des NMs qui offrent de multiples perspectives innovantes dans un large domaine d'applications industrielles. Des exemples de domaines d'application répertoriés par l'Anses [37] pour chaque type de NMs sont listés dans le tableau 2. Selon le Project "emerging nanotechnologies (PEN) du Consumer Products inventory (CPI)", l'inventaire le plus connu à travers le monde pour dénombrer le nombre d'applications liées au secteur des nanotechnologies, estime que plus de 1600 produits contenant des NMs ont été répertoriés [38]. Initialement, seulement 54 produits de consommation avaient été mis sur le marché en 2005, en 2013, ce nombre atteignait 1628 produits (Figure 2), alors qu'en 2017, c'est plus de 1800 produits qui ont été répertoriés selon la base de données du centre international Woodrow Wilson qui répertorie depuis 2005, à l'échelle de la planète, les produits contenant des NMs [39].

Tableau 2: Domaines d'application par type de nanomatériaux

Nanomatériaux	Domaines d'application	Exemples de produits finis
Nano-oxydes	Matériaux composites structuraux - Composants anti – UV - Polissage mécano-chimique des substrats (wafers) dans la microélectronique - Applications photocatalytiques, BTP	Additifs alimentaires, peintures, cosmétiques, encres, pneumatiques
Matériaux nanométralliques	Secteurs antimicrobiens et/ou de la catalyse - Couches conductrices des écrans, les capteurs ou encore les matériaux énergétiques.	Pansements, films alimentaires, revêtements (réfrigérateur), plans de travail, vitres ou murs autonettoyants, vêtements, matériaux en contact de denrées alimentaires, emballages alimentaires ingérables.
Noirs de carbone	Transports, BTP, imprimerie	Pneumatiques, encres, peintures
Matériaux nanoporeux	Aérogels pour isolation thermique dans les domaines de l'électronique, de l'optique et de la catalyse - domaine biomédical pour des applications de type vectorisation ou encore implants	Membranes de filtration de l'eau, peintures, colles, fertilisants
Nanotubes de carbone	Nanocomposites conducteurs électriques - Matériaux structuraux - nanoélectronique, biomédical	Raquettes de tennis, écrans souples, pare-chocs, phares, batteries, pneumatiques
Nanomatériaux massifs	Transports, BTP, équipements sportifs	Revêtements durs - Composants structuraux pour l'industrie aéronautique, l'automobile, les conduites pour les industries pétrolières et gazières, le domaine sportif ou encore le secteur anticorrosion
Dendrimères	Domaine médical, domaine cosmétique	Administration de médicaments, détection rapide
Quantum dots	Applications optoélectroniques (écrans)	Cellules photovoltaïques, encres et peintures pour applications de type marquage anti-contrefaçon
Fullerènes	Secteurs du sport (nanocomposites) et des cosmétiques	Mascaras, crèmes de beauté, balles de golf
Nanofils	Électronique, opto-électronique, photovoltaïque	Applications dans les couches conductrices des écrans ou encore les cellules solaires ainsi que les dispositifs électroniques

Source : [37]

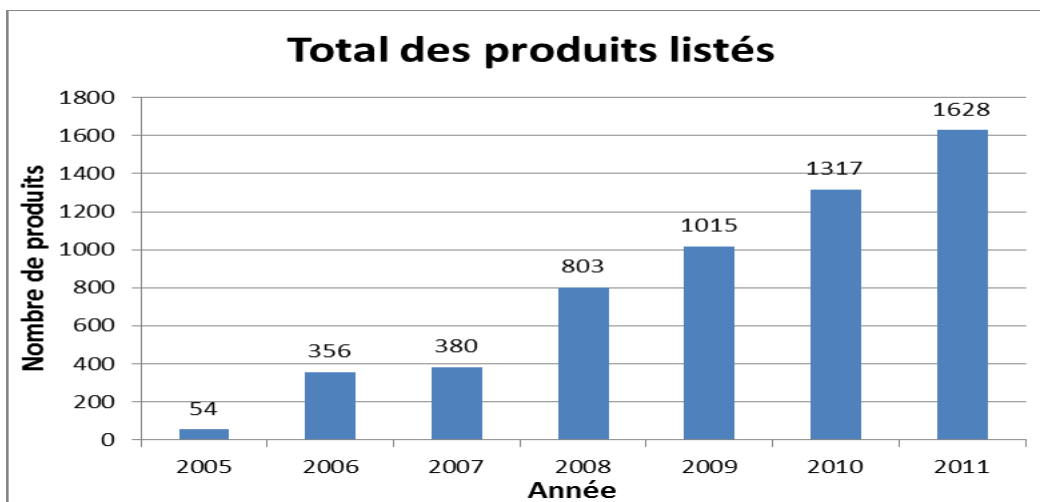


Figure 2: Nombre de produits de consommation basés sur la nanotechnologie disponible sur le marché.

1.5 Évaluation du risque toxicologique des nanomataériaux

L'origine de la méthodologie d'Évaluation Quantitative des Risques Sanitaires (EQRS) remonte aux années 40 aux États-Unies, avec pour objectif initial d'établir des seuils ou limites d'expositions aux substances chimiques en dessous desquels aucun effet néfaste n'était susceptible d'apparaître [40]. Ce n'est qu'en 1983 que le National Research Council (NRC) a proposé officiellement le paradigme d'évaluation du risque chimique, maintenant considéré comme la référence au niveau international [40]. La démarche d'évaluation du risque se décline en quatre étapes, soit **l'identification du danger, l'estimation de la relation dose-réponse, l'estimation de l'exposition et la caractérisation du risque et des incertitudes**. L'identification du danger et l'estimation du niveau d'exposition sont les deux piliers conceptuels du paradigme d'évaluation du risque [40]. Dans le cas particulier des NMs, il est particulièrement difficile de procéder à une évaluation quantitative du risques à partir de ce paradigme, initialement développé pour des produits chimiques conventionnels [41, 42]. En effet, le niveau de connaissance sur les dangers que peuvent représenter les NMs

sur la santé humaine et l'environnement est encore insuffisant pour conduire ce type de démarche [37].

Le début du développement des nanotechnologies fut initialement lancé sans une analyse des risques. Des organisations comme l'OECD [43] et des scientifiques [35, 44] prétendaient que les connaissances toxicologiques des matériaux de taille macroscopique de même nature constituait un point de départ approprié pour procéder à une évaluation classique du risque chimique des NMs. Cependant, si on prend l'or comme exemple, il est connu pour être un métal inerte chimiquement mais les nanoparticules d'or sont des agents réducteurs puissants lorsque leur taille diminue [45]. C'est pourquoi il est indispensable de prendre en compte dans l'évaluation du risque des NMs leurs propriétés uniques qui sont principalement des paramètres physico-chimiques (taille, composition chimique, agglomération...). Ces paramètres sont totalement absents des tests de toxicité classique. L'évaluation des risques des NMs sur la santé humaine et sur l'environnement devient de plus en plus préoccupante avec le développement des nanotechnologies et l'augmentation du nombre de produits commerciaux, industriels et de consommation comportant des nanomatériaux dans leur composition.

1.6 Nanotoxicologie: l'émergence d'une discipline

Grâce à leurs propriétés particulières, les nanotechnologies présentent de nombreuses applications potentielles. Selon l'inventaire du « Woodrow Wilson International Center for Scholars », l'utilisation des NMs est particulièrement accrue dans les produits de santé et de bien-être, ce qui inclut les produits d'hygiène personnelle, les vêtements et les cosmétiques [46]. Cela implique une exposition humaine de plus en plus importante aux NMs, ce qui peut dans certains cas être préjudiciable, car ironiquement, ce sont ces propriétés qui rendent les NMs attrayantes pour diverses utilisations qui posent de nouveaux risques pour la santé humaine [7, 35, 47]. Ceci explique la récente émergence de la nanotoxicologie, une nouvelle branche de la toxicologie, qui s'intéresse plus particulièrement aux problèmes de santé que peuvent représenter les NMs. Apparue au milieu des années 2000, la nanotoxicologie est présentement un domaine de recherche en pleine expansion en considérant le nombre de publication qui a beaucoup progressé depuis (Figure 3) [47].

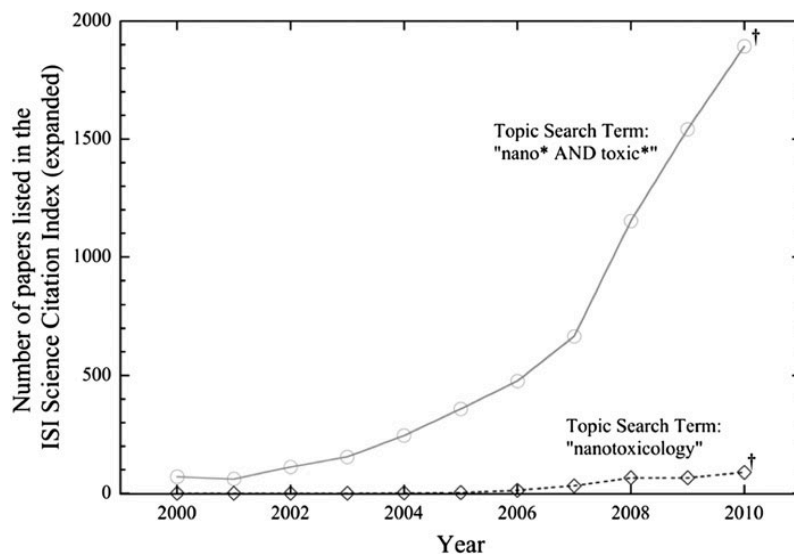


Figure 3: Publications liées à la nanotoxicologie

Source : [47]

Les fondements de cette nouvelle discipline ont été établis par Oberdörster [35] où il définit la nanotoxicologie comme un lien entre les nanosciences, les nanotechnologies et la toxicité des composés qui en résultent sur les organismes. Parmi ses objectifs, il faut favoriser un développement sécuritaire des nanotechnologies en identifiant les facteurs importants pour la toxicité des NMs. Des facteurs importants comme les paramètres physico-chimiques des nanomatériaux ont un effet certain sur la toxicité [8, 9, 35].

1.6.1 Propriétés uniques des nanomatériaux

Les NMs possèdent trois principales propriétés importantes par rapport aux matériaux micrométriques ou massifs dues principalement à leur petite taille, à leur grande surface spécifique et à leur réactivité de surface. Leur petite taille augmente leur potentiel de pénétrer plus profondément dans l'organisme et ainsi de passer d'un système (digestif, pulmonaire...) à un autre via la circulation sanguine. De façon générale, à l'échelle nanométrique, plus le diamètre des particules est petit plus le nombre d'atomes se trouvant en surface est grand et donc plus le potentiel de moduler des réponses biologiques est élevé [48]. Une particule de 10 nm de diamètre aura une surface spécifique 10 fois plus importante qu'une nanoparticule de 300 nm de diamètre. Cela représente une surface disponible 10 fois plus réactive pour interagir avec les membranes biologiques [35]. Cette augmentation de la surface a pour

conséquence une plus grande réactivité chimique et donc une plus grande facilité à pénétrer dans les cellules du corps humain, sachant que la réactivité des NMs est principalement liée aux propriétés de surface [49]. Toutefois, au-delà de ces propriétés spécifiques aux NMs manufacturés, d'autres paramètres comme la forme, l'agglomération, la composition chimique, la structure cristalline peuvent influencer leur comportement vis-à-vis des organismes vivants [50]

1.6.2 Importance de la caractérisation en nanotoxicologie

Les effets toxicologiques des NMs ont commencé à être examinés de plus en plus ces dernières années et les toxicologues portent beaucoup plus d'attention aux différentes caractéristiques affectant la toxicité des particules. Il est désormais admis qu'en nanotoxicologie, une caractérisation physico-chimique complète des NMs est indispensable dans toute étude toxicologique *in vitro*, *in vivo* ou *in silico*. Cette caractérisation permet d'évaluer la dangerosité des NMs en effectuant des liens de cause à effet entre les caractéristiques physico-chimiques du nanomatériau et des effets biologiques observés. Bien que la diversité des NMs soit très grande, il est préconisé de caractériser les NMs selon plusieurs paramètres physico-chimiques, régulièrement identifiés comme majeur dans la toxicité observée [35, 51, 52], (Tableau 3).

Tableau 3: Principales caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux pouvant influencer leur toxicité.

Facteurs liés aux nanomatériaux déterminant leur toxicité	
Composition chimique	La nature chimique des nanomatériaux (notamment métallique), ainsi que la présence d'autres composés (comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les métaux de transition : fer, nickel, etc.) adsorbés sur leur surface, sont susceptibles d'influer sur leur toxicité. En effet, les métaux de transition interviennent dans des réactions aboutissant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène
Taille	Une diminution de la taille des particules ou des fibres favorise leur pénétration dans les cellules, le passage des barrières biologiques et leur migration dans l'organisme
Surface	La surface spécifique d'une particule est inversement proportionnelle à sa taille. Or la réactivité chimique d'une particule dépend notamment de sa surface. Ainsi, une diminution de la taille des particules et des fibres induit une augmentation de leur réactivité chimique et biologique (interactions avec les différents tissus, cellules et fluides biologiques de l'organisme, dénaturation des protéines...). Elle favorise également la pénétration de certaines substances dans l'organisme : celles-ci sont absorbées et peuvent atteindre divers sites.
Nombre	L'augmentation du nombre des particules favorise la pénétration dans l'organisme
Forme	La toxicité semble être aggravée par la forme fibreuse ou filamenteuse des nanomatériaux. Les particules longues comme les nanotubes ou les nanofilaments seraient plus toxiques que les particules sphériques de composition chimique identique.
Structure	La structure cristalline, pour les composés minéraux (comme la silice), peut contribuer à moduler les propriétés toxicologiques des nanomatériaux.
Solubilité	La solubilité conditionne le devenir des nanomatériaux dans l'organisme humain.
Degrés d'agrégation et d'agglomération	Dans les faits, les nanomatériaux individuels existent rarement. Aussitôt formés au cours des divers procédés, ils ont tendance à s'agréger (par des liaisons chimiques « fortes ») ou s'agglomérer (par des liaisons physiques « faibles ») en amas de plus grande dimension. Ces deux phénomènes peuvent modifier le dépôt des nanomatériaux dans l'organisme, leur pénétration dans ou à travers les cellules et leurs effets biologiques.

La caractérisation complète des paramètres physico-chimiques des NMs requiert de nombreuses techniques analytiques [37]. À savoir, les techniques de la microscopie électronique à transmission ou à balayage permettent la visualisation des NMs isolées ou agrégées, fournissant ainsi des informations sur leur taille, leur morphologie et sur leur structure cristalline. La taille des agglomérats est déterminée par microscopie à diffusion dynamique de la lumière (DLS). Le potentiel zêta (état de charge) quant à lui, peut être évalué par des techniques impliquant des champs électriques, telles que l'électrophorèse (mesures de mobilité électrophorétique). Une caractérisation complète des NMs implique une diversité d'équipements onéreux et des techniques de mesure pour les caractériser. En conséquence, les études toxicologiques qui réalisent une caractérisation complète des NMs étudiés sont modestes pour des raisons principalement financières et logistiques. Toutefois, ces études s'intéressent principalement à la mesure de la taille initiale ainsi de leurs agrégats, un paramètre considéré comme primordial pour toute étude en nanotoxicologie. Enfin, en raison du nombre de techniques requis pour la caractérisation des NMs, de la diversité des NMs et des différentes connaissances scientifiques que nécessitent les études de nanotoxicologie, ceci nous montre à quel point cette nouvelle branche de la toxicologie est une discipline très complexe [35, 47].

1.6.3 Toxicité *in vivo* et *in vitro* des nanomatériaux

L'évaluation de la toxicité des NMs est réalisée à la fois sur des cellules (*in vitro*) et sur des modèles animaux (*in vivo*). Les expériences *in vivo* (surtout rongeurs) permettent de déterminer les voies potentielles de pénétration dans l'organisme, les mode d'action impliqués dans la biodistribution des NMs dans les différents organes et les mécanismes d'élimination des NMs [53]. Les études *in vitro* utilisent des cellules humaines ou animales éternisées mises en culture ou encore des cultures primaires. Ce type de technique est très avantageux sur plusieurs points : (i) la possibilité d'étudier des mécanismes impliqués dans la toxicité en isolant un type de tissu et d'en identifier plus précisément les mécanismes d'actions des nanomatériaux sur le système cellulaire. Une bonne compréhension des mécanismes de toxicité des NMs permet de développer de nouveaux produits moins à risque [54]; (ii) les cellules en culture sont plus rapides et peu coûteuses comparés aux modèles *in vivo*, ce qui permet d'établir un niveau de risque d'un plus grand nombre de NMs [55, 56];

(iii) enfin, les débats éthiques et morales sur les expérimentations animales sont minimisés avec les études *in vitro* en limitant les coûts et l'utilisation d'animaux à des fins d'expérimentations.

Chaque modèle (*in vivo* ou *in vitro*) a des avantages et des inconvénients. Néanmoins, il semble indispensable pour des questions légales, morales et éthiques de promouvoir l'utilisation le plus possible des modèles *in vitro* en tant qu'alternative à l'expérimentation animale et ces modèles devraient occuper à l'avenir une place encore plus importante en nanotoxicologie. L'approche qualitative de CB développé dans ce travail tiendra compte essentiellement des tests toxicologiques *in vitro*. Ceci ne veut pas dire qu'on peut se passer entièrement de l'expérimentation animale, ce type de recherche reste parfois indispensable vu que les études *in vitro* ne permettent pas de prendre en compte la complexité des processus et des modes d'action sur des modèles vivants. De nouvelles méthodes prédictives de l'évaluation de la nanotoxicité ont été développées : les modèles *in silico*. Ils ont pour but de déterminer un lien entre la structure d'une substance et son activité (RQSA, ou QSAR pour quantitative structure-activity relationship en anglais) par le biais d'un modèle mathématique, qui permettrait de prédire des effets toxiques et ainsi de modéliser un phénomène biologique [57]. Néanmoins, ces modèles ne peuvent être évalué correctement considérant les lacunes relatives à la toxicité des NMs, d'autres tests *in vitro* et *in vivo* seront nécessaires pour confirmer ou infirmer les implications toxicologiques des NMs. L'utilisation combinée de méthodes *in silico* et des modèles expérimentaux est hautement souhaitable car cela engendre une meilleure compréhension des phénomènes traités dans un domaine de recherche.

2. Approche du Control Banding (ou gestion graduée des risques)

2.1 Origines

La protection de la santé des travailleurs a connu vers la fin du 19^{ème} siècle, un nouvel intérêt avec les premières valeurs limites d'exposition professionnelle établis en Allemagne en 1886 ou 1887 [58]. L'interprétation des données d'exposition des travailleurs à des substances chimiques dans l'air, reposait traditionnellement sur la comparaison des expositions individuelles à une VLEP. En 1946, la Conférence américaine des hygiénistes industriels gouvernementaux (American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)), a présenté dans son rapport, la première liste des « concentrations maximales admissibles » de 148 produits chimiques, renommée en 1956 les valeurs seuils d'exposition (Threshold Limit Value (TLV)) de l'ACGIH [59]. Dans les années 60, cette méthode d'analyse quantitative pour la gestion des risques a été adoptée par la plupart des pays industrialisés afin de réduire les maladies liées au travail [60]. Ces initiatives ont fait probablement partie intégrante de l'amélioration des conditions de travail qui a conduit à une augmentation de la qualité de vie de nombreux travailleurs ainsi qu'une diminution des coûts liés à leur indemnisation [59]. En effet, du moins aux États-Unis, l'incidence des maladies et des accidents au travail a diminué au cours des 30 dernières années, selon le ministère du travail, Bureau of Labor Statistics des États-Unis [61].

En dépit des contributions favorables à la santé et la sécurité des travailleurs, l'approche traditionnelle d'évaluation du risque chimique est devenue de plus en plus ardue au cours des dernières décennies, en raison du nombre croissant de produits chimiques utilisés en milieu de travail et du coût de l'évaluation du danger et de l'exposition des travailleurs à ces substances chimiques [62]. L'augmentation des produits chimiques potentiellement dangereux dépassait de loin la capacité et les ressources des gouvernements et d'autres organismes externes pour mener des recherches toxicologiques et épidémiologiques afin d'établir les VLEP [60]. Pour faire face à cette situation, la Commission européenne a promulgué en 2006 un règlement concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques (REACH) qui transférait la responsabilité au fabricant de veiller à la sûreté des produits chimiques fabriqués, importés, commercialisés et employés [59]. Toutefois, le règlement REACH n'a pas résolu les difficultés inhérentes liées à l'établissement des VLEP. En effet, au tournant du 21^{ème} siècle, la problématique de la

protection de la santé des travailleurs ne cesse de croître avec un nombre croissant de produits chimiques dangereux et un nombre assez statique de VLEP [60]. On estime qu'à peu près 170 000 substances chimiques peuvent exiger leur enregistrement en vertu du règlement européen REACH [63]. Seuls environ 1000 produits chimiques en usage dans la Communauté Européenne sont soumis à des valeurs limites d'exposition professionnelle [64], et le UK Health and Safety Executive (HSE) a mis en place des VLEP pour environ 600 produits chimiques [65]. Pourtant, plus de 100 000 produits chimiques commercialisés dans la Communauté Européenne [60], sont non réglementés et donc sans valeur limite d'exposition spécifique. Le problème est tout aussi redoutable aux États-Unis où le Registre de Chemical Abstract Services (CAS), une division de la société américaine de chimie, répertorie plus de 156 millions de substances organiques et inorganiques [66]. Le processus de fixation des VLEP demande une forte consommation de ressources humaines et financières. Ces ressources encore limitées rendent la gestion de l'exposition aux produits chimiques difficile notamment dans les PME et les pays en développement. Il est de plus en plus évident que les difficultés liées à la fixation des VLEP ne sont pas complètement résolues et que cette approche quantitative ne résoudra pas le problème de la protection de la santé des travailleurs à l'échelle mondiale. Pour relever ces défis, les entreprises individuelles, les associations professionnelles et les organismes gouvernementaux ont mis en lumière des approches novatrices pour protéger à la fois la santé des travailleurs et l'environnement [59]. L'industrie chimique fut parmi les premiers secteurs à haut risque à adopter des méthodes d'évaluation qualitatives/semi-quantitatives visant l'évaluation et la gestion rationnelle des risques sanitaires pour la santé et la sécurité qui résultent de défaillances dans les principales installations chimiques. L'industrie pharmaceutique a mis au point dans le but d'assurer la sécurité de ses travailleurs, un outil d'évaluation et de gestion des risques sanitaires pour permettre l'utilisation sécuritaire de nouveaux produits chimiques, ne disposant pas de limites d'exposition réglementaire ou encore de données concernant leur toxicité ; il s'agit de l'approche de Control Banding (ou « gestion graduée des risques » en français).

2.2 Présentation de l'outil

Le CB est une approche qualitative ou semi-quantitative combinant à la fois l'évaluation et la gestion des risques liés à la manipulation de substances dangereuses n'ayant pas de valeurs

limites d'exposition professionnelle ou pour lesquelles il existe peu ou pas de données concernant leur toxicité. Lorsque les données sont incomplètes, il est préférable de faire une évaluation qualitative ou semi-quantitative des risques et d'adopter une approche de précaution. L'approche CB consiste généralement à regrouper ces substances en bandes de danger tout en tenant compte de l'estimation de l'exposition pour déterminer des moyens de maîtrise du risque sans avoir recours à des mesures de l'exposition dans la perspective de réduire le risque à un niveau sécuritaire pour la santé [67, 68]. En d'autres mots, l'approche vise à constituer des groupes de dangers et des groupes d'exposition pour identifier des moyens de maîtrise du risque, rassemblés également sous forme de groupes, d'où provient d'ailleurs le terme anglo-saxon de « control banding ». Le principe général d'évaluation du risque selon l'approche du Control Banding s'appuie sur des techniques simplifiées de modélisation et des méthodes de calcul de scores pondérés [67]. Ces scores sont attribués aux niveaux de danger (danger intrinsèque de la substance) et d'exposition classés par bandes établies sur la base des connaissances actuelles des NMs mis en œuvre et utilise des hypothèses prudentes pour estimer les informations manquantes. Dans ce processus, à chacune de ces bandes correspond une stratégie de maîtrise du risque en fonction des scores obtenus à la suite de leur multiplication ou sommation. Cette démarche d'évaluation propre à l'approche du Control Banding peut se résumer en quatre étapes principales (Figure 4) [63, 69] :

1. Classification des substances selon leur danger,
2. Estimation de l'exposition potentielle des travailleurs,
3. Évaluation du risque par le croisement des indices de danger et d'exposition potentielle,
4. Sélection de l'approche de maîtrise et de contrôle à partir des scores de risque (application de bonnes pratiques d'hygiène industrielle complétées par le port d'EPI (équipement de protection individuelle), utilisation de systèmes d'extraction localisée, confinement, avis spécialisés nécessaires).

		Bandes de probabilité d'exposition			
		BPE1	BPE2	BPE3	BPE4
Bandes de danger	BD1	CB3	CB3	CB4	CB4
	BD2	CB2	CB2	CB3	CB4
	BD3	CB1	CB1	CB2	CB3
	BD4	CB1	CB1	CB1	CB2

Figure 4: Matrice des bandes de contrôle à mettre en place suite à la combinaison du niveau de danger et de l'estimation de l'exposition

Les bandes de danger sont définies à partir des niveaux de sévérité de danger des produits chimiques par les toxicologues et d'autres experts de différents domaines qui établissent la classification de ces groupes de danger sur la base de connaissances scientifiques actuelles comme la taille et la morphologie des particules, la solubilité et la toxicité du produit. Quant aux expositions, elles sont regroupées en fonction de la durée de l'exposition, de la tâche effectuée et de la quantité utilisée (cas des produits chimiques), ainsi que de la volatilité des produits et la capacité de génération de poussière. Le croisement des bandes de danger et d'exposition permet de définir le niveau de contrôle du risque. À chaque niveau de contrôle correspondent des moyens techniques de prévention à mettre en place pour réduire le risque à un niveau sécuritaire pour la santé [59, 70]. Les quatre bandes de contrôle sont généralement les suivantes :

- ⇒ **CB1** : Utilisation de bonnes pratiques d'hygiène industrielle et de ventilation générale.
- ⇒ **CB2** : Utilisation d'un contrôle technique, généralement une ventilation locale par aspiration.
- ⇒ **CB3** : Isolation et confinement : systèmes fermés en continu
- ⇒ **CB4** : Consultation d'un expert

2.3 Avantages et limites de l'approche Control Banding

Reconnue aujourd'hui par de nombreuses organisations internationales (OMS, BIT, NIOSH, l'IOHA...), l'approche CB est très répandue, donnant lieu à des conférences internationales régulières sur le sujet (8ème Control Banding Workshop lors du congrès international de

l'IOHA à Washington en septembre 2018). Cette approche a aussi fait l'objet d'une revue de la littérature par le NIOSH [59], dans le but de montrer l'intérêt du CB pour gérer les risques liés à la manipulation de substances dangereuses ne disposant pas de VLEP. L'approche CB présente toutefois des avantages et des inconvénients

- Le CB est considéré comme étant un outil pratique pour fournir des directives de contrôle de risque pour les PME ne pouvant idéalement pas avoir recours à l'expertise d'un hygiéniste du travail. Néanmoins, l'utilisation de cette méthodologie sans expertise pourrait également conduire à des hypothèses non appropriées qui ne satisferont pas les exigences de prévention des risques professionnels.
- Le CB vise objectivement l'évaluation du risque chimique sans avoir recours aux mesures métrologiques et ce afin de maîtriser l'exposition. Toutefois, les bandes d'exposition dans un tableau de Control Banding peuvent permettre l'exposition à un plus large éventail de niveaux de concentration de produits chimiques et ainsi ces bandes n'offriront pas une bonne protection pour les travailleurs comparativement à une VLEP, déterminée à la lumière de recherches scientifiques. De plus, le CB ne permet pas d'établir le profil d'exposition des travailleurs ni de faire de la surveillance environnementale [67]
- Le CB est une approche d'évaluation et de gestion des risques à la santé uniquement. Cette démarche ne traite pas des risques pour la sécurité des travailleurs (risque incendie-explosion) ni des risques pour l'environnement [70]
- Le CB en tant que méthode a fait l'objet de plusieurs études de validation mais jusqu'à présent il n'existe pas de méthode universelle [71]. Pour les situations habituelles (un seul produit de toxicité connu), les résultats semblent concluants tandis que pour les cas particuliers qui ne sont pas prévus dans le modèle les résultats obtenus ne permettent pas de conclure [72]

La communauté internationale en santé et sécurité du travail (SST) est d'avis qu'il s'agit d'une approche très attractive pouvant être utilisés sans expertise technique locale et sans mesure d'exposition coûteuse. Pourtant les chercheurs en SST indiquent que l'approche de

CB ne saurait se substituer aux mesures métrologiques ni à l'expertise nécessaire d'hygiène industrielle. De plus, en l'absence d'une approche validée, il serait nécessaire de continuer à surveiller et à évaluer les mesures de contrôle des risques et de l'exposition réelle des travailleurs. Par conséquent, la communauté internationale en SST est d'avis qu'il s'agit d'une approche qui est appelée à être améliorée et affinée pour qu'elle soit de plus en plus répandue. Cette même communauté anticipe que l'utilisation de l'approche du CB permettra d'augmenter la protection des travailleurs et de diminuer les effets sur la santé liés aux produits chimiques [37, 59, 67]

2.4 Le CB appliqué aux NMs

Tel que mentionné plus tôt, dans le cas particulier des NMs il est difficile de procéder à une évaluation quantitative des risques. Les connaissances concernant les dangers, les niveaux d'exposition et les risques sont, pour l'heure, limités pour conduire ce type d'évaluation. Dans ce contexte, une méthode qualitative d'évaluation des risques fournit une alternative intéressante aux méthodes quantitatives utilisées en hygiène du travail. Parmi ces méthodes, l'approche de CB basée sur une classification par «bandes de danger» et «bandes d'exposition» peut être utilisée pour la mise en place des moyens de protection des travailleurs exposés aux nanomatériaux manufacturés [49]. Dans le cadre des NMs, l'approche de CB tend à combler les lacunes relatives à la toxicité des NMs en considérant leurs propriétés physico-chimiques (réactivité, solubilité...) et ce pour faciliter l'évaluation et la gestion des risques liés aux nanomatériaux sur le lieu de travail [11].

La première approche conceptuelle d'application pour les NMs a été proposée par Andrew Maynard [73]. Présentement, six outils de CB applicables au cas des nanomatériaux ont été développés par plusieurs pays [11]. Les finalités et le principe général de fonctionnement de ces approches sont assez proches avec néanmoins quelques divergences concernant leur principe détaillé de fonctionnement (domaine d'application, limites, bandes de danger et d'exposition, etc.). Une description et une comparaison des forces et faiblesses des six outils de CB développés jusqu'à présent pour les NMs sera présentée dans la section «articles scientifiques» [74]. Enfin, une phase de validation de ces outils est manifestement nécessaire pour démontrer l'efficacité des systèmes utilisant l'approche de CB comme méthode

alternative aux VLEP d'une part et d'autre part pour améliorer ces méthodes vers une évaluation de plus en plus «semi-quantitative».

2.5 Problématique et objectifs

La littérature a permis de constater qu'il existe des lacunes importantes en ce qui concerne l'évaluation des dangers des NMs selon leurs paramètres physico-chimiques et biologiques. Les outils CB développés pour les NMs sont de nature qualitative, en réponse à une exposition et adaptée aux différents milieux de travail. Il est possible de bonifier l'approche en proposant une approche semi-quantitative du volet danger. C'est dans cette perspective que s'inscrit cette recherche « Revue de littérature sur le Control banding : proposition d'une méthode semi-quantitative selon des critères physico-chimiques et biologiques des nanomatériaux manufacturés ».

Il nous est apparu important de développer une approche de CB lié à la caractérisation des dangers potentiels des NMs, permettant d'identifier et de quantifier le degré de dangérosité des NMs pour un meilleur encadrement de leurs impacts sanitaires et une manipulation dans une perspective nanosécuritaire et contrôlée des postes de travail.

L'objectif général et spécifiques de ce mémoire sont :

Objectif général

Développer une approche novatrice de CB basée sur les principaux paramètres physico-chimiques et biologiques des NMs pour mieux caractériser et quantifier leur réactivité pour mieux en estimer les impacts sanitaires et mettre en œuvre de meilleures stratégies de manipulation sécuritaire.

Objectifs spécifiques

1. Faire un état de l'art des 20 dernières années sur l'approche CB, ainsi qu'une description et une comparaison des forces et faiblesses des principaux outils de CB développés jusqu'à présent pour les NMs

2. Identifier et mettre en relation les principaux paramètres physico-chimiques des NMs et l'activité biologique dans une perspective d'établir des corrélations et de standardiser la grille conçue.

3. Proposer une approche semi-quantitative d'évaluation des dangers basée sur les paramètres physico-chimiques et de toxicité des NMs pour mieux caractériser leur niveau de dangérosité, étant donné que les approches proposées sont toutes de nature qualitative en réponse à une exposition

CHAPITRE 2: LES ARTICLES SCIENTIFIQUES

Article # 1 : Nanomaterials, and Occupational Health and Safety—A Literature Review About Control Banding and a Semi-Quantitative Method Proposed for Hazard Assessment.

Kaotar Dimou¹, Claude Emond^{1,2}

⁽¹⁾ Department of Environmental and Occupational Health, University of Montreal School of Public Health (ESPUM, École de santé publique de l'Université de Montréal), C.P. 6128, Succ. Centreville, Montréal, Québec, Canada

⁽²⁾ BioSimulation Consulting Inc., 2915 Ogletown Road, #1182, Newark, DE, 19713, USA

*Statut : Cet article a été soumis au Journal of Physics : Conference Series 838 012020 et a été accepté et publié

Abstract

In recent decades, the control banding (CB) approach has been recognized as a hazard assessment methodology because of its increased importance in the occupational safety, health and hygiene (OSHH) industry. According to the American Industrial Hygiene Association, this approach originates from the pharmaceutical industry in the United Kingdom. The aim of the CB approach is to protect more than 90% (or approximately 2.7 billion) of the world's workers who do not have access to OSHH professionals and traditional quantitative risk assessment methods. In other words, CB is a qualitative or a semi-quantitative tool designed to prevent occupational accidents by controlling worker exposures to potentially hazardous chemicals in the absence of comprehensive toxicological and exposure data. These criteria correspond very precisely to the development and production of engineered nanomaterials (ENMs). Considering the significant lack of scientific knowledge about work-related health risks because of ENMs, CB is, in general, appropriate for these issues. Currently, CB can be adapted to the specificities of ENMs; hundreds of nanotechnology products containing ENMs are already on the market. In this context, this qualitative or semi-quantitative approach appears to be relevant for characterizing and quantifying the degree of physico-chemical and biological reactivities of ENMs, leading towards better control of human health effects and the safe handling of ENMs in workplaces. The need to greater understand the CB approach is important to further manage the risks related to handling hazardous substances, such as ENMs, without established occupational exposure limits. In recent years, this topic has garnered much interest, including discussions in many technical papers. Several CB models have been developed, and many countries have created their own nano-specific CB instruments. The aims of this research were to perform a literature review about CBs, to classify the main approaches that were developed worldwide, and then to suggest an original methodology based on the characterization of the hazard. For this research, we conducted a systematic literature review over the past 20 years. This approach is important in understanding the conceptual basis for CB and the model's overall effectiveness. These considerations will lead to the proposal of an original hazard assessment method based on physico-chemical and biological characteristics. Such a method should help the entire industry better understand the ability of the CB approach to limit workers' exposure, while

identifying the strengths and weaknesses of the approach. Developing this practice method will help to provide relevant recommendations to workers who handle hazardous chemicals such as ENMs and to the general population.

1. Introduction

Since 2000, nanotechnology has grown dramatically in all industrialised countries. Back then and even now, the advent of the infinitely small particle through nanotechnology is considered to be the industrial revolution of the twenty-first century [75]. However, the idea to manipulate matter at the atomic and molecular levels was raised explicitly by American physicist Richard Feynman during his famous lecture from 1959 that was titled “There Is Plenty of Room at the Bottom” [76]. In 1974, Japanese professor Norio Taniguchi coined the term of “nanotechnology” [77]. However, the era of nanotechnology really arrived in 1986, thanks to the development of new sophisticated tools such as the scanning tunnelling microscope and the atomic force microscope [3, 78]. Therefore, remarkable progress is being made in a variety of fields such as energy, environment and health [79].

Nowadays, nanotechnology is a multidisciplinary research field in which an increasing variety of engineered ENMs are synthesised [10]. According to International Organization for Standardization (ISO)/TS 80004-1, one or more external dimensions of ENMs are in the size range of 1 nm to 100 nm. At the nanoscale level, ENMs have unique physical and chemical properties, which make them an attractive candidate for a wide range applications in a variety of revolutionary scientific fields [80]. Most industrialised countries are investing heavily in nanoscience and nanotechnology research and development around the world (in the United States of America, China, Japan, Russia and European countries) [10, 81]. Nevertheless, rapidly developing nanotechnology and the growing utilisation of ENMs in consumer and industrial products have led to a potential increase of human exposure, thus raising concerns of many scientists and governments regarding health risks to workers and the public [82-84]. Investigators supported some initiatives to implement the industry’s and researchers’ use of ENMs in nanotechnology. A survey was initiated among industries and researchers working in different specialties that were potentially involved in the development, production, distribution and integration of ENMs and use of ENMs-

containing products [85, 86]. Indeed, the fear among public health institutions in several countries has increased regarding the quantitative health risk assessment of ENMs [10].

In 1983, the National Research Council first proposed a health risk assessment [87]. The four steps of this approach include source characterisation, hazard characterisation, exposure characterisation and risk characterisation. The principle of the health risk assessment is based on “the use of the factual base to define the health effects of exposure of individuals or populations to hazardous materials and situations” [87]. In the case of ENMs specifically, it will be virtually impossible to assess the potential occupational health hazard, given the almost limitless uncertainties of ENMs [11]. In such an uncertain context, in which current data regarding the toxicity of ENMs remain fragmented [88], quantitative health risk assessment (QHRA) is purely hypothetical. Thus, a risk assessment method for controlling ENMs exposures remains mainly qualitative or semi-quantitative in nature [12]. The qualitative risk assessment method, known as “control banding (CB),” is an alternative approach to QHRA that has some drawbacks that limit its use in nanotechnology; therefore, the current work is in this context. It is important to develop an approach of CB based on characterisation of potential hazards posed by ENMs. Characterisation is necessary to identify and quantify the degree of hazardousness of ENMs to establish a better framing of their health implications and to ensure safe handling of these ENMs. [89, 90] designed the first portion of the methodology to integrate QHRA and CB, thereby integrating a semi-quantitative approach for the assessment of ENMs. The second portion of the methodology is underway and is a part of the initiative in this current paper.

The core structure of this paper is organised in a step-wise manner. In Section 2 (Methods), we provide the literature search strategy that includes the study selection and data collection processes. This review provides the information that we observed regarding why these matrices were developed and their limitations, In Section 2, we also discuss the CB strategy and describe the main CB tools that have been developed specifically for ENMs. This synthesis is important in understanding the key concepts for CB and the implications of this approach’s overall effectiveness, and then for proposing our approach. In Section 3 (Result and Discussion), we present the results from the literature search and our proposed assessment tool of ENMs based on physico-chemical and biological characteristics. In

Section 3, we also briefly discuss the approach developed as an innovative hazard assessment method, which is different from the previously developed approaches. This paper discusses the ongoing project, addressing where we are so far, and the perspective of this project. Section 4 (Conclusion) of this paper presents an overview of the state of the project and describes the future work needed to complete it.

The aims of this research were to perform a literature review about CBs, to classify the main CB approaches that were developed worldwide and then to suggest an inventive methodology based on the characterisation of the hazard.

2. Methods

2.1 Literature Search Strategy

The study was conducted to cover the period from January 1996 to November 2016. The review was limited to only French and English papers. The following databases were searched: Toxline, PubMed, Web of Science, ScienceDirect and Google Scholar. The research strategy was based on four major concepts: CB, ENMs, physico-chemical characteristics and biological characteristics. Many keywords were used that referred to different complementary concepts that all linked to ENMs. The keywords were as follows: agglomerate and biological characterisation of ENMs, carbon nanotubes, CB tools, engineered ENMs, exposure banding, hazard assessment, nanotechnology, nanotoxicity, physicochemical parameters of ENMs, quantum dots and risk banding.

Furthermore, the governmental reports of recognised organisations were considered. Some of these organisations included the Robert-Sauvé Research Institute for Occupational Health and Safety (l'Institut de recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du travail [IRSST]), the National Agency for Food Safety, Environment and Labor (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [ANSES]) and NIOSH (the National Institute for Occupational Safety and Health). This review also considered conference abstracts (e.g. Nanosafe International Conferences on Safe Production and Use of ENMs) and theses and dissertations. This search also included specialised databases, taking to account primary and secondary, literature documents. The purpose of this work was not to conduct an exhaustive review of all of the studies published

to date, but to identify the major documents, thereby obtaining a better understanding of the prioritisation of work regarding CB strategy, CB tools specifically developed for ENMs for ENMs and physicochemical and biological properties of ENMs. The aims of this review were to understand how the CD tools were developed and to identify the parameters in these matrices.

A total of 932 references were identified through bibliographic databases searches. An additional 50 references were obtained through other Internet sources. After removing duplicates, a total of 832 records were available for title review/abstract screening. Out of the 832 references, 91 (11%) records remained for a comprehensive review. After the comprehensive review of the 91 records, only 51 (6%) of these records were included in this literature review.

2.2 New Methodology Approach Based on CB, but for Health Hazard Characterisations of ENMs

The new method developed during the current work and discussed in this paper aims to evaluate the health hazards resulting from the use of ENMs, with the objective to protect workers and the general population from hazardous situations. This method is based on the CB approach that classifies several levels of toxicological hazards from ENMs; however, as discussed in this paper, our first intend in that project did not take exposure into consideration at this step. This approach is based exclusively on relevant physico-chemical and biological characteristics of ENMs. The levels of toxicological hazards used in the current method will combine four or five physico-chemical characteristics and the same number for the toxicological tests. The combination of these hazard bands will lead to the development of a decision matrix tool to establish a control level, and then to make recommendations for the workers who handle hazardous chemicals such as ENMs and for members of the general population who might be exposed in the workplace.

We believe that the current method can be used to classify the ENMs according to their intrinsic reactivities with biological materials to establish a limit for the ENMs that currently do not have any reference values. It is important to mention that in this paper, we will discuss several potentials tests that could be used in this matrix. However, another

exhaustive literature review will be necessary to identify the tests commonly used by different laboratories. All of these tests will be challenged by extensive criteria not discussed in this paper. A validation will then be required before a decision is made regarding the prioritisation of tests to be used to characterise the hazards. Thus, the validation component is not included in this current work.

3. Result and Discussion

3.1 Results from the Literature Search

These CB-type tools for ENMs that were developed between 2008 and 2012 have already been described in detail and reported in published studies for a comparative analysis [37, 38, 45, 46, 52]. The authors of these publications reviewed many of these CB tools for ENMs relating to their scope and applicability, hazard and exposure banding parameters and risk classification or control bands. It is evident from the scope of each of the strategies that they were developed for different purposes. For example, the CB Nanotool was created to protect nanotechnology researchers, whereas the Precautionary Matrix was created to identify and prioritise risks, considering the health of workers and consumers, as well as the environment. The CB methodology should not in any way be compared with the other tools because it is not a matrix that allocates hazard and exposure bands; instead, the methodology is only being used to determine whether there is a need for action. These Guidance were developed to help employers and workers with identifying the risks associated with different work situations. NanoSafer and the Stoffenmanager Nano were applied to assess and manage occupational risks during the synthesis and downstream use of ENMs in workplace settings and at laboratories.

3.2 Origins of the CB Strategy

CB, which is used as a risk management strategy, was developed as a simplified approach to conduct a qualitative risk assessment and to take measures to protect workers and the public. In a historical context, CB has grown from a number of qualitative risk assessment strategies that began to appear in the 1970s because of events that involved explosions, radiation, lasers and biological agents [59, 91]. In the early 1990s, the pharmaceutical industry implemented the CB method that was used to manage chemical risks to employees

in the workplace [91]. In 1994, the Health and Safety Executive (HSE) in the United Kingdom initially developed the CB method, which was known as the Control of Substances Hazardous to Health Essentials (COSHH Essentials), primarily to benefit small- and medium-sized enterprises (SMEs) that may not have the expertise of a full-time occupational hygienist on staff or as a consultant [13, 17].

This approach was designed to help SME employers to carry out suitable and sufficient risk assessments for all chemicals used in the workplace and to take steps to ensure that exposure is adequately controlled [13, 92]. This regulation was intended to increase the emphasis on the use of risk assessments in the industry to protect human health [62]; however, many challenges were experienced regarding their effective implementation. An unpublished survey of 2000 companies revealed “widespread ignorance of the regulations and their implications”[93]. The main challenge was that the SMEs did not understand the requirements of the COSHH Essentials and “wanted to be told exactly what they need and do not need to do” [59, 94]. However, there may be little practical use for occupational exposure limits (OELs) in small companies, given that SMEs often lack the financial and technical resources to conduct toxicological and epidemiological research to establish the OELs and collect and analyse samples [59]. With the challenge indicated, the SMEs have experienced increased difficulties with assessing and ensuring appropriate protection for their workers [95]; therefore, an alternative, user-friendly method to protect workers from adverse health effects of hazardous chemicals was needed. This concept was the origin of CB.

Strictly speaking, CB represents a qualitative strategy that originates from industrial hygiene and offers solutions and control measures to ensure the safety of workers who use new chemicals, for which reliable toxicological and exposure data are absent [92, 96]. These new chemicals were classified into “bands,” mainly defined according to the hazard level of known products similar to those used, taking into consideration exposure assessments. Each band corresponded to a risk control strategy [97]. In one of the least complex forms of CB, a four-level hierarchy of risk management options for controlling exposures to chemicals includes: (1) effective occupational hygiene practices, which may

be supplemented by using appropriate personal protective equipment; (2) engineering controls, including local exhaust ventilation; (3) containment and (4) the need to seek advice from specialists [59].

To determine the appropriate control strategy, the exposure potential may be estimated by quantity of use, the volatility of liquids or dustiness of solids and the frequency and duration of exposure, and the potential hazard may be captured in what is known as a risk phrase [R-phrase] that were required by the European Union and used to rank the hazard of a chemical [59, 91]. The use of R-phrases or their equivalents in the Globally Harmonized System for Classification and Labelling of Chemicals in CB is helpful, but it is not intended to replace OELs, exposure assessments, or classic industrial hygiene protocols [59]. The majority of the CB methods focus the resources on preventing workers' exposure to chemicals; however, the CB method was not intended to be a predictive exposure model, but rather a way to sort work processes into bands. Simply stated, the CB method was a way to link hazards to general control plans [59, 98]. The CB method is recognised by many national and international organisations and is being increasingly applied worldwide as a practical approach to meet the needs of SMEs and developing countries for addressing chemical hazards. CB has been internationalised by the International Labour Organization [92, 99]. Of all of the forces that drive the evolution of the CB model, there was an increasing recognition that the traditional process was losing ground. In fact, reliance on this approach has become increasingly difficult because of the growing number of potentially hazardous materials in the workplace that do not have OELs, specifically ENMs that are currently used in occupational settings [91, 100].

3.3 CB Tools for ENMs

Various countries have developed a variety of CB strategies [62]. In recent years, several nano-specific CB methodologies for different types of workplace environments (e.g. small and large industries and laboratories) have been developed and published, and each instrument has specific strengths and limitations [101]. The remainder of Section 3 of this review presents a brief summary and the purpose of each of the six instruments used for

ENMs. These six instruments are the CB Nanotool, the Precautionary Matrix, the ANSES CB Tool for ENMs, NanoSafer, The Guidance and Stoffenmanager Nano.

3.3.1 CB Nanotool (United States of America)

In 2008, Paik et al. developed the CB Nanotool as a strategy for performing a risk assessment and protecting nanotechnology researchers at the Lawrence Livermore National Laboratory [14, 102]. The CB Nanotool is intended to be used by both experts and non-experts for providing recommendations for appropriate engineering controls [14, 101]. The CB Nanotool is a simplified approach based on the paradigm established by the COSHH Essentials that uses a four-by-four factor risk matrix (Table 1) to determine the risk level (RL) [103-105]. The specific RL is determined by a “severity” score on one axis and by a “probability” score on the other axis [14]. The severity score is based on a mix of intrinsic properties of ENMs and on the presence or absence of health effects (four bands for the hazard). The probability score is based on interaction of the worker in the workplace and the ENMs (four bands for the exposure) [14]. The lack of data resulted in high scoring. The issue with this scoring, it is difficult to apply a summation of items that were different such as a dermal hazard and solubility or particle shape and carcinogenicity. The maximum probability/severity score is 100 (Table 1). In fact, the combination of severity and probability leads to an overall four possible RL control bands with corresponding specific control strategies that can be classified in RL 1 to RL 4 [14, 106].

Table 1: The CB Nanotool matrix (modified based on research from Paik et al. 2008)

Severity	Probability			
	Extremely unlikely (0–25)	Less likely (26–50)	Likely (51–75)	Probable (76–100)
Very high (76–100)	RL 3	RL 3	RL 4	RL 4
High (51–75)	RL 2	RL 2	RL 3	RL 4
Medium (26–50)	RL 1	RL 1	RL 2	RL 3
Low (0–25)	RL 1	RL 1	RL 1	RL 2

Note: RL 1 = general ventilation; RL 2 = fume hoods or local exhaust ventilation; RL 3 =

containment; and RL 4 = seek specialist advice.

The severity scores are determined by using the physical-chemical characteristics of both the ENM and the parent material. The probability scores are determined by using the factors that determine the potential exposure of workers to ENMs [14]. The CB Nanotool provides indications regarding how to allocate scores for the severity factors and the probability factors. Then, the maximum scores can be attributed to each factor.

3.3.2 Precautionary Matrix (Switzerland)

The Swiss Federal Office of Public Health and the Federal Office for the Environment developed a Precautionary Matrix [107] in 2008 and revised the tool in 2010 [108]. The Precautionary Matrix was published almost at the same time as the CB Nanotool. The Precautionary Matrix is different from the CB Nanotool because the matrix also considers the workplace, consumers and the environment [16, 108]. This CB approach (i.e. the matrix) aims to guide SMEs to apply a precautionary method to identify possible sources of risk from the production, use and disposal of synthetic ENMs [107]. In contrast to the name, the Precautionary Matrix does not distinguish the bands for the hazard from the bands for exposure; however, the matrix does combine the hazard and exposure potential into a single score to determine whether there is a need for action [101, 109]. The total score is subdivided into two categories: Class A (lower score ≤ 20) and Class B (higher score ≥ 21) (see Table 2). The major issue is that the categories do not discriminate between the following: (1) hazard and exposure and (2) the sum of the pictograms based on different information about the amount of ENMs and work or consumer information that is related to the exposure. This approach requires some expertise to help ensure accurate interpretation. The precautionary matrix estimates the risk potentials—through the entire life cycle—for the health of workers and consumers and for the environment. The applicability of this CB approach is difficult, and global.

Tableau 2: Classification of ENMs based on overall score in the Precautionary Matrix (modified based on research from Höck et al. 2010)

Score	Classification	Importance
-------	----------------	------------

≤ 20	A	The nano-specific need for action can be rated as low, even without further clarification.
≥ 20	B	The nano-specific action is needed. Existing measures should be reviewed, further clarification undertaken and, if necessary, measures to reduce the risk associated

3.3.3 ANSES CB Tool for ENMs (France)

ANSES developed an operational CB approach for small- to large-sized enterprises during the synthesis and downstream use of ENMs in workplace settings and in laboratories [97, 101, 109]. The CB Tool for ENMs is only available as a paper version, and it is explicitly recommended that the users (academics and industrials) are adequately qualified to conduct work regarding chemical risk prevention [97, 104]. In the approach from ANSES, the control bands (levels) are determined by combining the bands for the hazard and the exposure (emission potential). ANSES uses five hazard bands that range from HB1 (very low [no significant risk to health]) to HB5 (very high [a severe hazard that requires an expert to perform a comprehensive hazard assessment]) [97]. The exposure bands are allocated based on the emission potential and can be grouped according to the following four levels: EP1 (solid), EP2 (liquid), EP3 (powder) and EP4 (aerosol) [97]. These five hazard bands and four exposure bands are directly linked to the five control bands associated with general recommendations that are ranked from lower CL1 (natural or mechanical general ventilation) to higher CL5 (full containment and review by a specialist are required) [97, 109, 110]. The hazard portion of the CB matrix (from ANSES) is based on the toxicity warning label that is associated with clinical observations. The issue regarding these criteria is that they are not specific enough; therefore, the criteria cannot be used to protect sensitive sub-populations. These criteria are based on general observations of large classifications and are not supported by quantitative data, with the exception of a large characteristic from the labelling that is used.

3.3.4 NanoSafer (Denmark)

Developed by the Danish Technological Institute and National Research Center for the Working Environment, NanoSafer is an online CB tool that helps manage the risks

resulting from the use of ENMs [102, 111]. Currently, there is only a Danish version of this tool, which is intended for SMEs and laboratories that do not have any or have limited experience in producing or working with ENMs [101, 111]. NanoSafer focuses on the work environment, and application of the tool is limited to assessing the handling of nanopowder products and fugitive and point-source emissions [101, 109]. In NanoSafer, four bands are allocated for the hazard and five bands are for the exposure. In addition, there are five RLs (control bands) [101] that range from RL1 (low hazard and low exposure potential) to RL5 (high hazard and/or moderate to very high exposure potential) [111]. NanoSafer uses its e-learning tool to make recommendations that are suitable control measures for each RL [111]. Because NanoSafer relies on the size of the ENMs, such as nanopowder, and the OEL of the application, it is relatively accepted that the sizes of ENMs are proportional to the toxicity and related to the surface. However, it is also true that two ENMs of the same size may have vastly different toxicities. It is important to note that only considering the size of the ENMs will provide an indication, but this criterion will not be strong enough to ensure an accurate and valid assessment. The issue regarding hazards is much more complex than that.

3.3.5 The Guidance (The Netherlands)

The Guidance was developed by the Confederation of Netherlands Industry and Employers (Verbond van Nederlandse Ondernemingen-Nederlands Christelijk Werkgeversverbond [VNO-NCW]) and two Dutch trade associations, the Dutch Federation Vakbeweiging (Federatie Nederlandse Vakbeweiging [FNV]) and the Christian National Trade Union (Christelijk Nationaal Vakverbond [CNV]). The purpose of The Guidance is to guide employers and employees in identifying the risks associated with the use of ENMs and nanoproducts during different work situations [112]. The Guidance has a list of 10 generic activities for making an inventory of ENMs that are produced or used along their life cycle within a company [101, 112]. In The Guidance, the following three hazard categories for ENMs and nanoproducts are identified: 1 (soluble nanoparticles), 2 (synthetic, persistent nanoparticles) and 3 (fibrous, nonsoluble nanoparticles) [112]. The exposure bands are allocated based on the emission potential from the different activities related to the production of polymeric nanocomposites: I (there are no emissions of free nanoparticles

due to working in full containment), II (emissions of nanoparticles embedded in a matrix are possible) and III (emissions of free nanoparticles are possible) [112, 113]. Hazard and exposure data are collected and combined in a decision matrix to establish a control level (Table 3).

Table 3: The decision matrix to determine the risk management class and the control level for activities with ENMs and nano-enabled products (adapted from The Guidance, Version 4.2 dated August 2012)

Description of the hazard category for each nano-enabled product	Hazard category 1 Rigid,	Hazard categories 2a and 2b Biopersistent granular	Hazard category 3 Non-biopersistent
Probability of exposure to nanoparticles during activities			
Exposure category I: Emission of primary nanoparticles is possible.	A	A	C
Exposure category II: Emission of nanoparticles embedded in a larger solid (>100 nm) or liquid matrix is possible	A	B	C
Exposure category III: Emission of free nanoparticles is minimised due to working in full containment	B	C	C
A	The hierarchic Occupational Hygienic Strategy will be strictly applied, and all protective measures that are both technically and organisationally feasible will be implemented. The reasonableness principle is not used.		
B	According to the hierarchic Occupational Hygienic Strategy, the technical and organisational feasible protective measures are evaluated regarding their economic feasibility. Control measures will be based on this evaluation.		
C	Sufficient (room) ventilation, if needed, is applied to local exhaust ventilation and/or containment of the emission source and use appropriate personal protective equipment.		

3.3.6 Stoffenmanager Nano (The Netherlands)

Developed by the Netherland's Organisation for Applied Scientific Research (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek [TNO]) and Arbo Unie, Holland, the Dutch Stoffenmanager Nano [114] is a generic tool that has both Dutch and English versions. The Stoffenmanager Nano was initially developed as a practical approach for scanning electron microscopy (SEMs) and also for laboratory work to support researchers with assessing, prioritising and controlling occupational risks during the synthesis and downstream use of ENMs [110, 114]. This CB approach is intended to be

used by non-expert employees at SMEs [109]. The Stoffenmanager Nano combines five hazard bands (i.e. low, average, high, very high or extreme); the highest band is associated with the highest risk priority, irrespective of the exposure band [114]. The potential hazard level is assessed based on how it relates to the ENMs properties (i.e. size, shape and solubility) and the toxicological data available, together with the properties of the parent material [114, 115]. The Stoffenmanager Nano uses five exposure bands that are expressed by using a sophisticated algorithm and includes the most important exposure parameters, taking into account various aspects from the source of the ENM in the breathing zone of the workers [104, 115]. The combination of these hazard and exposure bands leads to three overall risk prioritisation bands that can be classified as 1 (the highest priority) to 3 (the lowest priority) [114].

The results of the literature review provided interesting information about how and where CB originated, how CB has been used in the past, and how CB is organised or structured. From this review, it was observed that each CB matrix described one or a few parameters related to the exposure. These parameters are usually related to a physical property of the ENMs (e.g. length, size, volatility, solubility). These physico-chemical properties integrated limited information that can be used to characterise the nanoparticles to help control risk. Other methods describe the CB approach that is used to determine the severity of a potential effect on the probability which depends on the manipulation of ENMs [36]. In this case, the matrix is a two-pronged account that is based on criteria of physical and health effects information to determine the severity and on the workplace information about exposure to derive the probability. This matrix is still fuzzy and needs an expert judgment to obtain a good interpretation. More effort should be made to improve the hazard characterisation of the nanoparticles. Thus, one way to improve this approach is to characterise the ENMs by using chemical and biological analysis tests, which, when combined, can provide a discriminate level of hazard. This characterisation of the hazard can be associated with a second banding graph, during which the hazard is correlated to the exposure classification, and then the risk assessment is estimated.

3.4 New Methodology Presented After the Literature Review

After reviewing the CB tools that have been developed specifically for ENMs, all of these tools are qualitative in nature and are based on the exposure. More specifically, all of the hazard criteria used in these different CB methods that were evaluated during this literature review missed the point of really characterising the ENMs based on their major characteristics. In fact, the series of parameters presented for each CB developed and reviewed as part of the current work is incomplete and based on classical occupational safety approaches. We believe that the literature review performed as part of our research about the CB approaches has revealed that the best thing that we can do to protect the workers and the general population exposed to ENMs is to use the established conventional occupational health methods. In fact, currently it is impossible to perform quantitative risk assessments because there is a lack of data. With that said, from the perspective of using a better and more relevant approach to conduct risk assessments, what can be done to improve the tool that is currently being used? This is why a new methodology to improve the hazard assessment is presented in this paper. The criteria of the tests selected for the new methodology are based on the availability of the analysis tools, the cost and the level of information that can be obtained from this analysis. The objectives are to maximise the information collected with tests and minimise the cost of the test. Of course, during the selection and prioritisation, more criteria may be added to obtain the best selection as possible, and then to characterise the reactivity of the ENMs.

This new approach is called a semi-quantitative hazard assessment method and is based on the CB approach and on the physico-chemical and toxicological tests of the ENMs. This new approach may help to quantify and interpret the levels of hazards from working with ENMs and with maximum confidence and minimum uncertainty regarding future recommendations to the workers who handle hazardous chemicals such as ENMs and to the general population.

The first phase of this work involved the development of an assessment tool of ENMs, based on the National Research Council's (NRC's) approach [90] in the publication titled "Integrated Approach to Design and Safe Handling of Nanomaterials—A Program Based

on a Dialogue Between Industry and Evaluators of Health Risks,” which was published on the Web site for IRSST. The second phase of this work is underway (part of this initiative of the current paper). The second phase is needed to review the literature about the development of CB across time and to select the appropriate chemical and biological characterisation tests, which will be standardised and then assessment tools will be developed. Some examples of the potential tests that can be used are presented in Table 4. For the physico-chemical characterisations, we have selected tests that describe the properties we want to measure. For example, there is a linkage between the size of the ENMs and toxicity. In general, the small nanoparticles have a higher toxicity, partly due to both the reactivity and to the proximity of the nucleus. Another example might be the surface chemistry of the nanoparticles. Therefore, two nanoparticles having the same size, but with different surface chemistries, will yield different toxicities. For each test, Table 4 also lists the equipment that can be used to perform analyses of this physical property. It is important to note that the list in Table 4 is not exhaustive because we are in the first step of this process.

Table 4: Physico-chemical characteristics of ENMs and suitable evaluation equipment

Physico-chemical characterisation	Instruments and methods
Size (size distribution, agglomeration)	Transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy and Raman scattering
Shape of nanoparticles	TEM and near-field scanning optical microscopy
Chemical composition	Secondary ion mass spectrometry and nuclear magnetic resonance
Surface (surface charge, surface area)	Zeta potential, TEM and attenuated total reflection–Fourier transform infrared

Stability (colloidal stability, solubility)	Zeta potential, dynamic light scattering and circular dichroism
Crystal structure	X-ray diffraction

The method also considers the biological characterisations of ENMs (Table 5). In this table, we tend to analyse the biological reactivity of the ENMs through interaction with the biology. In this characterisation, only the *in vitro* tests were considered because there is a budget issue regarding application in the industry. For example, the viability assay and the oxidative stress test are two major tests to analyse for toxicity. The right column in Table 5 lists some examples types of tests that are available to measure this toxicity.

Table 5: Toxicological tests of nanoparticles (*in vitro* toxicity)

Toxicological testing of ENMs	Tests available
Viability assay	Neutral red, resazurin test and Trypan blue exclusion assay (for cell counting)
Oxidative stress and inflammation tests	Superoxide dismutase activity, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione transferase, nuclear transcription factor–kappa B and interleukins (IL-1, IL-6, IL-8)
Apoptosis assay	Caspase activity assay and membrane asymmetry
Mitochondrial activity assay	MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) or WST1 (water-soluble tetrazolium salts) assay
Metabolic activity test	Sulforhodamine B (SRB) assay
Membrane integrity test	Lactase dehydrogenase (LDH [or LD]) test

To determine which tests will be incorporated in the assessment tool, more work needs to be done during the third phase. In addition, a validation based on different criteria is

required and will be explored during the second phase of the project. The results from the second phase will be presented in another paper.

The list of physical and biological tests selected will represent an original hazard assessment approach that can be used to characterise the ENMs. The selection and the analysis will be used to produce a hazard matrix (Table 6). Nevertheless, at this point, it is impossible to determine with some certainty which tests that correspond to the validation component will be used. To determine the list of tests, several criteria will be considered (e.g. widely used, inexpensive or free, easy to conduct and provides the information needed regarding the reactivity).

Table 6: Assessment tool of nanoparticles based on physico-chemical and biological characteristics

Physicochemical	TEST A	TEST B	TEST C	TEST D	TEST E
Biological					
TEST A	Yellow	Orange	Red	Red	Red
TEST B	Yellow	Yellow	Orange	Red	Red
TEST C	Green	Yellow	Yellow	Orange	Red
TEST D	Green	Green	Yellow	Yellow	Orange
TEST E	Green	Green	Green	Yellow	Orange

Note: The risk factors are as follows: green = lower; yellow = moderate; orange = less high; and red = high.

The objectives of the literature review were to understand the CB tool and to understand the history of its development and how the CB tool has evolved over time. The goal of our new methodology is to provide a tool that uses an original hazard assessment method to compare the physico-chemical and biological characteristics of ENMs. The CB tool will be used by occupational safety workers who are in charge of conducting hazard evaluations for workers and the general population. The literature review has allowed us to understand what tools have been developed for CB to protect workers who have been potentially exposed to ENMs. The major observations were that the CB matrix is based on one

physico-chemical characteristic or on a cluster of physical or chemical properties and clinical observations. These parameters were then compared to the exposure scenario. Reviewing these studies, we came at the conclusion that a better approach should be developed to improve the hazard characterisation of the ENMs.

The new approach developed to characterise the ENMs was very important step in this project. In fact, a comprehensive assessment of the physico-chemical and biological characterisations of ENMs is a key element of any ENM toxicity screening strategy. In this study, we were primarily interested in the characterisation of ENMs to analyse this reactivity with biological materials. Indeed, it is necessary to characterise the ENM that is intended for therapeutic use in both its originally manufactured condition and after its introduction into a physiological environment. The proposed method will contribute towards a better knowledge of ENMs to anticipate their potential effects on humans.

The proposed method discussed in this paper will require validation before it can be used as a semi-quantitative CB approach. It is important to remember that our aim in this paper was not to present the final version of proposed semi-quantitative method. We are currently selecting the most relevant physico-chemical and biological parameters of ENMs. The selection process and the findings will be discussed in upcoming paper. This method is not intended to be a substitution of existing methods currently in use to manage the hazards posed by chemicals. This proposed method is different from the approaches that have been developed by other agencies. The other approaches assess and characterise the risk for workers and the general population on a semi-quantitative basis. Nevertheless, it was important in this paper to identify a minimum number of *in vitro* studies that could generate a maximum amount of information. *In vitro* studies can generate reproducible results as quickly as possible at an affordable cost for industrialists. The toxicology and physico-chemical tests that will be selected will be the most suitable and commonly used in the nanotechnology field.

4. Conclusion

During the literature review, we evaluated how the CB models were developed and how they work. There were different observations regarding how the models were developed and how the parameters remained in each CB. The major problem with the CB models reviewed in this current paper is the hazard information required is not always available from the Material Safety Data Sheet; therefore, expert judgment is often required. Following the comprehension of CB, including the strengths and weaknesses, a new semi-quantitative methodology of CB is proposed for the Human Health Hazard Assessment based on physico-chemical and biological characteristics of ENMs. This new approach is original because it is dependent upon the structure of ENMs, but it is not based only on the exposure on the first intend. It is important to develop this CB approach based on the characterisation of potential health hazards posed by ENMs to identify and quantify the degree of hazardousness of ENMs to establish a better framing of their health implications and to ensure safe handling of these nanoparticles. In particular, this proposed method is a practical tool that will to help provide relevant recommendations to the general population and particularly to the workers who handle ENMs and hazardous chemicals, thereby bolstering employees' confidence in adopting a sophisticated hazard assessment approach by using objective and validated criteria. At this point, the limitation of this method is that all tests suggested in this paper must be validated before a decision is made regarding the prioritisation of tests to be used for characterising the hazards. This limitation corresponds to Step 3 of our certification process of this methodology, which was not presented during the Nanosafe 2016 meeting in Grenoble, France. Nevertheless, this CB method, based on characterisations of the potential hazards posed by ENMs, is required in order to develop better guidelines regarding health implications that will ensure safe handling by employees in workplace settings, as well for the general population, which could come into contact with ENMs. From this dependent hazardous assessment, it is possible to combine this assessment and the exposure assessment. The scientific knowledge of the risks associated with ENMs is constantly changing, both with regard to physico-chemical characteristics and toxicology. Thus, it is therefore mandatory to update information regularly by integrating these new data into the CB method used in this study.

5. References

1. Lungu, M., et al., *Nanoparticles' Promises and Risks*. 2015.
2. Feynman, R.P., *There's plenty of room at the bottom*. Miniaturization"(HD Gilbert, ed.) Reinhold, New York, 1961.
3. Camille, L.P., *Les nanotechnologies: Concepts et applications*. 2013: Lavoisier.
4. Drexler, K.E., *Engines of creation 2.0: the coming era of nanotechnology*. 2006.
5. Lintz, P., *Analyse et enjeux éthiques des nanotechnologies en médecine: temps et discours, approche éthique systémique: double discours, approche psychanalytique: complémentarité des discours entre science et théologie*. 2014, Université Paul Valéry-Montpellier III.
6. Iavicoli, I., et al., *Opportunities and challenges of nanotechnology in the green economy*. Environmental Health, 2014. **13**(1): p. 1.
7. Binet, S., et al., *les nanomatériaux manufacturés à l'horizon 2030*. 2015, INRS.
8. Luther, W. and A. Zweck, *Safety aspects of engineered nanomaterials*. 2013: CRC Press.
9. Ezema, I.C., P.O. Ogbobe, and A.D. Omah, *Initiatives and strategies for development of nanotechnology in nations: a lesson for Africa and other least developed countries*. Nanoscale research letters, 2014. **9**(1): p. 1-8.
10. Vogel, U., et al., *Handbook of nanosafety: Measurement, exposure and toxicology*. 2013: Elsevier.
11. Fransman, W., et al., *Comparative Human Health Impact Assessment of Engineered Nanomaterials in the Framework of Life Cycle Assessment*. Risk Analysis, 2016.
12. Nielsen, E., *Human Health and Nanomaterials in Consumer Products*. Literature Review for the Region of Peel's Public Health Unit, 2008.
13. Endo, C.-A., et al., *Portrait de la nanotechnologie au Québec dans les milieux industriels et de la recherche universitaire et publique*. R-854, 1-90. IRSST. 2015.
14. Ostiguy, C., et al., *Mapping the use of engineered NM in Quebec's industries and research laboratories*. *Journal of Physics: Conference Series* 429, 1-8.. 2013.
15. NRC, *Risk assessment in the federal government: Managing the process*. 1983, Washington (DC), National Academy Press.
16. Anses, *Méthode d'évaluation des niveaux de risques sanitaires et des dangers écotoxicologiques*. 2015.
17. Emond, C. and L. Multigner. *Human Risk Assessment and Its Application to Nanotechnology: A Challenge for Assessors*. in *Journal of Physics: Conference Series*. 2015. IOP Publishing.
18. Anses, *Enjeux et mise à jour des connaissances*. 2014.
19. Emond, C., S. Kouassi, and F. Schuster, *Development of an integrative program of nanosafety: Promote the coordination between industries and risk assessor*. *Journal of Physics: Conference Series* 429, 1-10. 2013.
20. Emond, C., S. Kouassi, and F. Schuster, *Approche intégrée pour une conception et une manipulation sécuritaires des nanomatériaux - Un programme basé sur une concertation entre l'industrie et des évaluateurs des risques sanitaires*. R-877 , 1-35. 2015. (Report) 2015.

21. NIOSH, <*Qualitative Risk Characterization and Management of Occupational Hazards Control Banding (CB)-2.pdf*>. 2009.
22. Zalk, D.M. and D.I. Nelson, *History and Evolution of Control Banding: A Review*. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 2008. **5**(5): p. 330-346.
23. Russell, R., et al., *An introduction to a UK scheme to help small firms control health risks from chemicals*. Annals of Occupational Hygiene, 1998. **42**(6): p. 367-376.
24. Naumann, B.D. *Control banding in the pharmaceutical industry*. in *Occupational Hygienists Conference Proceedings*. 2005.
25. Nelson, D.I. and D.M. Zalk, *Control Banding: Background, Critique, and Evolution*, in *Patty's Industrial Hygiene*. 2011, John Wiley & Sons, Inc.
26. Skordal, K., *Control Banding Tools: Advanced Regulated Evaluation and Authorization of Chemicals Tool and Agreement with Professional Judgment*, M. Yost, J. Camp, and N. Seixas, Editors. 2012, ProQuest Dissertations Publishing.
27. Seaton, A., *Control of substances hazardous to health*. BMJ: British Medical Journal, 1989. **298**(6677): p. 846.
28. Topping, M., *Occupational exposure limits for chemicals*. Occupational and environmental medicine, 2001. **58**(2): p. 138-144.
29. Oldershaw, P., *Control banding workshop, 4–5 November 2002, London*. Annals of Occupational Hygiene, 2003. **47**(7): p. 531-532.
30. Zalk, D.M. and G.H. Heussen, *Banding the world together; the global growth of control banding and qualitative occupational risk management*. Safety and health at work, 2011. **2**(4): p. 375-379.
31. Anses, *Development of a specific control banding tool for nanomaterials*. Expert committee (CES) on physical agents. French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety, Maisons-Alfort Cedex, 2010.
32. Erbis, S., et al., *Review of Research Trends and Methods in Nano Environmental, Health, and Safety Risk Analysis*. Risk Analysis, 2016.
33. Chalupka, S., *Control Banding for Risk Management of Source Chemical Agents and Other Occupational Hazards*. Workplace Health & Safety, 2010. **58**(9): p. 404.
34. Garrod, A. and R. Rajan-Sithamparanadarajah, *Developing COSHH Essentials: dermal exposure, personal protective equipment and first aid*. Annals of Occupational Hygiene, 2003. **47**(7): p. 577-588.
35. Liguori, B., et al., *Control banding tools for occupational exposure assessment of nanomaterials—Ready for use in a regulatory context?* NanoImpact, 2016. **2**: p. 1-17.
36. Paik, S.Y., D.M. Zalk, and P. Swuste, *Application of a pilot control banding tool for risk level assessment and control of nanoparticle exposures*. The Annals of occupational hygiene, 2008. **52**(6): p. 419.
37. Sánchez Jiménez, A., et al., *A comparison of control banding tools for nanomaterials*. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 2016. **13**(12): p. 936-949.
38. Eastlake, A., R. Zumwalde, and C. Geraci, *Can control banding be useful for the safe handling of nanomaterials? A systematic review*. Journal of Nanoparticle Research, 2016. **18**(6): p. 1-24.
39. EU-OSHA, “*E-fact 72: Tools for the management of nanomaterials in the workplace and prevention measures*, 18,” 2013.

40. Hansen, S.F., A. Baun, and K. Alstrup-Jensen, *NanoRiskCat—a conceptual decision support tool for nanomaterials*. 2011, Danish Ministry of the Environment.
41. Zalk, D. and S.Y. Paik. *Risk Assessment Using Control Banding*. in *Elsevier Inc.* 2011.
42. Höck, J., et al., *Guidelines on the precautionary matrix for synthetic nanomaterials*. Federal Office for Public Health and Federal Office for the Environment, Berne, 2008.
43. Höck, J., et al., *Guidelines on the precautionary matrix for synthetic nanomaterials*. Federal Office for Public Health and Federal Office for the Environment, Bern, 2010.
44. Riediker, M., et al., *Development of a Control Banding Tool for Nanomaterials*. 2012. **2012**.
45. Brouwer, D.H., *Control banding approaches for nanomaterials*. *Annals of occupational hygiene*, 2012. **56**(5): p. 506-514.
46. Fleury, D., et al., *Nanomaterials Risk Assessment in the Process Industries: Evaluation and Application of Current Control Banding Methods*, in *Lp2013 - 14th Symposium on Loss Prevention and Safety Promotion in the Process Industries, Vols I and II*, E. DeRademaeker, et al., Editors. 2013, Aidic Servizi Srl: Milano. p. 949-954.
47. Jensen, K.A., et al. *NanoSafer vs. 1.1-nanomaterial risk assessment using first order modeling*. in *6th international symposium on nanotechnology, occupational and environmental health, Japan*. 2014.
48. Cornelissen, R., et al., *Guidance working safely with nanomaterials and products, the guide for employers and employees*. The Netherlands, Amsterdam, 2011.
49. Silva, F., et al. *Qualitative risk assessment during polymer mortar test specimens preparation-methods comparison*. in *Journal of Physics: Conference Series*. 2015. IOP Publishing.
50. Van Duuren-Stuurman, B., et al., *Stoffenmanager nano version 1.0: a web-based tool for risk prioritization of airborne manufactured nano objects*. *Annals of occupational hygiene*, 2012: p. mer113.
51. Xing, B., N. Senesi, and C.D. Vecitis, *Engineered Nanoparticles and the Environment: Biophysicochemical Processes and Toxicity*. Vol. 4. 2016: John Wiley & Sons.

Article # 2: Safety assessment of Engineered Nanomaterials (ENMs) using physicochemical properties an *in vitro* testing: A new approach methodology to improve the hazards assessment.

Kaotar Dimou¹, Claude Emond^{1,2}

⁽¹⁾ Department of Environmental and Occupational Health, University of Montreal
School of

Public Health (ESPUM, École de santé publique de l'Université de Montréal), C.P.
6128, Succ.

Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada

⁽²⁾ BioSimulation Consulting Inc., 2915 Ogletown Road, #1182, Newark, DE,
19713, USA

E-mail: claude.emond@umontreal.ca

*Statut : Cet article n'a pas été encore soumis.

Abstract

Rapid advances in nanoscience and nanotechnology and the increasing use of engineered nanomaterials (ENMs) in many products has increased growing concern, especially in regard to possible hazards to human health. A number of international research projects on Control Banding (CB) models for risk assessment of ENMs have been developed and are currently in use. So far, all of these models developed in this field are qualitative in nature and are based on the exposure. In this paper, we propose a new semi-quantitative methodology of CB based on characterisation of potential hazards posed by ENMs, without account for exposure factor on the first intend. Using literature review as a research methodology, we were able to identify the principal chemical and physical properties of ENMs (size, shape, aggregation...) having significant role on *in vitro* toxicity (oxidative stress, inflammatory reaction). This original approach based on physico-chemical and biological characteristics of ENMs is a practical tool that will to help provide relevant recommendations to the general population and particularly to the workers who handle ENMs and hazardous chemicals, thereby bolstering employees' confidence in adopting a sophisticated hazard assessment approach by using objective and validated criteria.

Key words: Nanotechnology, Nanomaterials, Control banding, hazard, physicochemical, *in vitro*

1. Introduction

With the rapidly growing of the field of nanotechnology in our everyday life, more than 1,000 nanoproducts already on the market and many more under development [116, 117]. In 2020, it has been estimated that the production of Engineered nanomaterials (ENMs <100nm) will increase by [mt]25 times what it is today [118]. The success story of nanotechnology in many scientific and technological fields as medicine, energy and electronics, consumer products, pesticides, food and pharmaceutical industries, could be explained by the exceptional physicochemical properties of ENMs (size, shape, charge, surface properties...) [119, 120]. There have been several studies have revealed that the same properties that make ENMs so attractive could also influence the potential toxic manifestations on the environment and human health [121-123]. Actually, a growing number of studies have demonstrated that ENMs have potential biological effects at the pulmonary, cardiac, reproductive, renal, cutaneous, and cellular levels [124]. Reckoning with these facts and given Human exposure to ENMs is increasing rapidly, it is imperative to assess safety of ENMs by assessing their physicochemical properties.

The safety of ENMs falls into a very new branch of toxicology called Nanotoxicology [125]. This discipline has been proposed address the gaps in knowledge and to establish the relationship between ENMs physicochemical properties and their potential adverse effects [126, 127]. Although substantial growth in the number of recent publications reporting on studies of developing strategies for assessing the safety of ENMs, toxicological evaluation of ENMs involves many difficulties. This is mainly due to the tremendous development of nanotechnologies that leads to the availability of a large number and a huge variety of ENMs with varying chemical composition, size, shape, crystal structure, surface area, surface chemistry and charge, solubility. . . etc.[119, 125]. Therefore, this makes it difficult to establish a consensus about which of those unique intrinsic or extrinsic properties can be at the origin of their potential biological danger [128, 129]. Moreover, it is recognized that as a result of their small size and unique physicochemical properties, the toxicological profiles of nanoparticles may differ considerably from those of larger particles composed of the same materials [120, 130].

It seems that the most reasonable approach to obtain toxicity information for the numerous ENMs without testing every single one is the semi-quantitative hazard assessment approach that we propose in this work. This hazard assessment approach inspired of the Control Banding approach appears to be promising for characterising and quantifying the reactivities of the ENMs by relating their biological activities to their physicochemical properties for a safe production of ENMs. Within this context that this study is being taken. In our previous paper [131], we performed an exhaustive literature review about CB approach, we classified the main CB approaches for ENMs that were developed worldwide, and then we proposed an original CB methodology of ENMs based on physico-chemical features and biological responses. In this paper, an attempt has been made to explain how physicochemical properties of ENMs correlate with biological response using CB approach. For this, we evaluated the current literature in order to identify the principal chemical and physical properties of ENMs (size, shape, aggregation...) having significant role on *in vitro* toxicity (oxidative stress, inflammatory reaction, genotoxicity...) by providing examples of the biological events emerging from laboratories. It would be of great value to get more insight the relationships between physicochemical properties of ENMs and toxicity level, not only to facilitate read across within classes of ENMs, but also to be able to set priorities for safety testing and/or to develop safer ENMs. This work of characterisation is required to identify and quantify the degree of hazardousness of ENMs ensuring safe handling of these substances.

2. Methods

The review of the most relevant contributions to the literature in the fields of nanotoxicology (including only *in vitro* studies), physics and chemistry of nanometer scale (physicochemical characteristics of ENMs) were found using PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Google Scholar (<http://scholar.google.com>), and ScienceDirect (www.sciencedirect.com). Keywords were used to locate relevant articles, and the following is an example of a typical search: [nanoscale OR nanoparticle OR nanomaterial* OR nanotoxic* OR nanoscience OR nanotechnolog*] AND [safe* OR toxic OR toxicity OR toxicology OR hazard* OR adverse effect]) AND helath OR physico-chemical characteristic. The aims of this review were to understand the possible correlation between physicochemical properties of ENMs with their toxic effects, and to select the appropriate physico-chemical and biological characterisation tests to standardize the hazard matrix produced in this study.

For the physico-chemical characterisation, according to the literature review conducted, we have selected a minimum set of physicochemical properties required to characterize ENMs. This is important to understand the relations between ENMs toxicity and their physico-chemical properties. The selection criteria of *in vitro* tests for the new semi-quantitative methodology of CB were based on the availability of the analysis tools, the cost and the level of information that can be obtained from this analysis. The objectives were to maximise the information collected with tests and minimise the cost of the test for industrialists. Of course, during the selection and prioritisation, more criteria may be added to obtain the best selection as possible, and then to characterise the reactivity of the ENMs. In other words, the *in vitro* testing and physico-chemical criteria selected were the most suitable and commonly used in the nanotoxicology field.

The present method in this paper is based on the “control banding (CB)” approach used in the industry for several decades and suggested as a pragmatic approach to manage the potential health risk resulting from exposure to ENMs. This new method proposed during the current work did not take exposure into consideration at this step. This approach is based exclusively on relevant physical, chemical and biological characteristics of ENMs. The

levels of toxicological hazards used in the current method combine six physico chemical characteristics and five toxicological tests previously selected. The combination of these hazard bands was led to the development of a decision matrix tool to establish a control level and then to make recommendations for the workers who handle hazardous chemicals such as ENMs and for members of the general population who might be exposed in the workplace. The initial version of this hazard matrix tool was presented during the Nanosafe 2016 meeting in Grenoble, France for peer review on the strategy being used.

3. Results

3.1 Data synthesis from the literature review

The search yielded more than 150 articles which were further reviewed for occupational content. At the end of this selection process, 80 articles published between January 2005 and December 2018 were deemed relevant to this review, and they were examined with particular emphasis on two topics: *In vitro* studies on the biological effects of ENMs in relation to the influence of physical, chemical, and combined characteristics. From this synthesis of the literature, a new semi-quantitative methodology of CB is proposed for the Human Health Hazard Assessment based on physico-chemical and biological characteristics of ENMs.

According to the literature review, every nanotoxicity assessment ideally begins with the physico-chemical characterization of the tested nanomaterial. It is the first step in modelling ENMs toxicity and this is usual request of particle toxicologists to chemists is to characterize their samples before *in vitro* and *in vivo* tests [132]. For this, Physicochemical characterization of ENMs is paramount in order to correlate biological/toxicological responses with these properties [133, 134]. However, establishing this correlation is not trivial. Despite the research performed in nanotoxicity over the past 10 years, there are still many gaps in the understanding and knowledge regarding this field. The enormous diversity of ENMs makes it very difficult to compare results of different studies when their characteristics are too diverse. Many scientists have conducted through characterizations of physicochemical properties of ENMs-types that are being assessed for toxicity testing. However, too often this characterization becomes an extensive laundry list of material characteristics that does not have adequate prioritization [135]. Until now, a complete and exact list of parameters influencing the toxicity

of ENMs has not yet been established [125].

Many authors [35, 136-139] proposed a list of physico-chemical characteristics that might be important to understand the relations between ENMs reactivity and their physico-chemical properties. Although there is still no scientific consensus about a complete and exact list of nano characteristics evaluation, we previously recommend that, at a minimum (prioritized) physicochemical properties (see Table 1) prior to conducting hazard studies for potential toxicity. Based on the studies found in the peer reviewed literature, 80% of these studies considered that physicochemical tests we have selected in this study are the most suitable to generate a maximum amount of information to understand the relations between ENMs toxicity and these tests physicochemical.

Table 1: Relevant physico-chemical characteristics of ENMs

Physico-chemical characterisation
Size and surface area
Shape
Surface charge
Chemical composition
Crystallinity
Aggregation

3.3.1 Effect of particle size and surface area on reactivity

Particle size is regarded as one of the most important nanocharacteristics from a toxicological perspective. By definition, ENMs possess at least one dimension below 100 nm, the small size gives them an opportunity for increased uptake into biological systems and then influence basic cellular processes, such as proliferation, metabolism, and death (Oberdorster et al., 2005). Several researchers have evaluated *in vitro* cytotoxicity of ENMs of different size employing different type of cell cultures, culture conditions, and exposure times [140-143]. The majority of *in vitro* studies have assessed the potential adverse health effects of ENMs, pointing out their ability to produce reactive oxygen species (ROS), release toxic ions, disrupt electron/ion cell membrane transport activity and cause oxidative damage and lipid peroxidation [144, 145]. For example (Park et al. 2011) investigated the effects of silver nanoparticles (AgNPs) with different particle size (20, 80, 113 nm) and made a comparison

in terms of cytotoxicity, inflammation, genotoxicity, and developmental toxicity. They concluded that effects of AgNPs on cellular metabolic activity and membrane damage were most pronounced potentially resulting in a myriad of secondary effects, such as generation of ROS, DNA damage and inhibiting stem cell differentiation. they concluded AgNPs of 20 nm were more toxic than the larger nanoparticles and induced effects in all endpoints studied. Besides, they demonstrated that AgNPs of 20nm were more cytotoxic than silver ions in L929 fibroblasts, but not in RAW 264.7 macrophages, while the Ag particles that were over 20 nm were less toxic than Ag-ions. In addition, the effects of Ag nanoparticles compared with Ag-ions on four human cell lines were also dependent on the size of the nanoparticles. In a similar case, (Zapór 2016) investigated the cytotoxic effects of AgNPs on both reproductive and pulmonary cells (CHO-9, 15P-1 and RAW264.7) using three different characteristic sizes of AgNPs (~ 10, 40 et 100 nm). They tested the effects of AgNPs on cell viability, cell membrane integrity, mitochondrial metabolic activity, lipid peroxidation, total oxidative and antioxidative status of cells and oxidative DNA damage. They concluded that all kinds of AgNPs had strong cytotoxic effects at low concentrations (2÷13 µg/ml) but the most toxic were particles below 10 nm. The cytotoxicity was mediated by the overproduction of reactive oxygen species. The ROS being formed in the cells caused oxidative damage to the genetic material (DNA). Furthermore, it was found that the AgNPs under study induced mitochondrial dysfunction, and an increase in cell membrane permeability, and therefore, risk should be considered when using nanosilver preparations and provide appropriate protective measures when they are applied. All such findings shown that the size of particles is a possible factor that may directly or indirectly contribute to their reactivity. However, this is not always the case. In some cases, it cannot be generalized that nanoparticles are always more toxic than micrometer-sized particles with the same chemical composition [146, 147].

On the other hand, on the nanoscale, as the size of ENMs decreases, its surface area per mass increases, providing a greater proportion of its atoms to be displayed on the surface [148]. The high surface area associated with ENMs results in increased pathophysiological toxicity mechanisms, for instance oxidative stress, ROS generation, mitochondrial perturbation [149]. Indeed, several studies in rodents employing a variety of different ENMs showed that specific surface area plays a critical role in interaction of materials with biological system (lung and other epithelial-induced inflammatory responses) [150]. Although particle size and

surface area are important factors in determining toxicity of ENMs, it is not the only factors that causes changes in the biological activities of materials at the nanoscale as mentioned by [126], there are other more properties of nanomaterials that influence toxicity include chemical composition and so forth as reviewed in the following sections.

3.3.2 Effect of particle shape on reactivity

In addition to size, the shape (aspect ratio) or morphology of ENMs is another important particle descriptor at nanoscale level. Shape of ENMs has been shown to have a pronounced effect on the biological activity. ENMs have very different shapes including fibers, spheres, tubes, rings, planes and the difference in shape may lead to differences in their toxicity effects. Indeed, there are several studies [151-153] investigating and confirming that the shape of ENMs can impressively influence their rate of uptake by biological systems. [151] reported higher uptake of spherical gold nanoparticles than gold nanorods with equivalent diameters into HeLa cells. Interestingly, internalization of nanorods is strongly dependent on their dimensions so that high-aspect ratio particles are internalized considerably faster than low-aspect ratio particles, i.e. more spherical particles [152, 154]. Nanorods were described as more cytotoxic than spherical gold ENMs on human skin HaCat keratinocytes [155]. Most of the knowledge about shape dependent toxicity is based on *in vitro* experiments. *In vitro* studies with carbon nanotubes (CNTs) reported significant effects and proved the importance of shape of ENMs in toxicity. [156] investigated adverse effects of single-wall carbon nanotubes (SWCNT) using a cell culture of immortalized human epidermal keratinocytes (HaCaT). Exposure of HaCaT to SWCNT, resulted in oxidative stress and cellular toxicity, as evidenced by the formation of free radicals, accumulation of peroxidative products, antioxidant depletion, and loss of cell viability. Additionally, exposure to SWCNT resulted in ultrastructural and morphological changes in cultured skin cells. Multiwalled carbon nanotubes (MWNTs) showed pro- inflammatory effects and were internalized in keratinocytes [157]. [158] showed that long MWCNT are more toxic than short MWCNTs. In fact, after intra-abdominal instillation of long MWCNTs, the MWCNTs could cause inflammation of the abdominal wall, with formation of lesions known as granulomas, while no inflammatory response was observed with short MWCNT, as they were effectively taken up by macrophages with efficient phagocytosis. A most recent study on leech's macrophages assessing the direct effects of MWCNTs on immune system was conducted by [159]. The

study provides evidences to support that MWCNTs are able to induce a plethora of inflammatory responses leading both the decrease of cell proliferation rate and the increase of the apoptotic rate. Furthermore, since oxidative stress is linked with inflammation, reactive oxygen species has been evaluated confirming that their production rate increases after MWCNT treatment.

3.3.3 Effect of nanomaterial surface on reactivity

In addition to ENMs size and shape, surface properties play critical role in defining how ENMs interact with the tissue, proteins, cells, and even subcellular components [160]. Important properties in defining the ENMs surface include more aspects such total surface area, surface charge (surface electrostatic status of NPs), chemical reactivity, presence of functional ligands, hydrophobicity, roughness, etc. According to [161-163], the surface charge was one of the most important ones. They concluded that is an important factor that needs to be considered for the complete characterization of ENMs, because it plays a critical role in biological toxicity of ENMs. Indeed, the surface charge is critical in cellular internalization, as it contributes to the ENMs biocompatibility and therefore cytotoxicity [164]. Various aspects of ENMs such as colloidal behaviour is primarily regulated by surface charge of nanoparticles [165]. As surface charge is a major determinant of colloidal behaviour, it specifically influences the organism response upon exposure to ENMs by changing their shape and size through aggregate or agglomerate formation [166]. Surface-functionalized cationic ENMs (positively charged) have been shown to be more cytotoxic than those of anionic (negatively charged) or neutral ENMs *in vitro* studies [120, 167]. The plasma membrane is negatively charged, as is the intracellular environment, thus anionic ENMs may be endocytosed at a lower rate than the cationic ones. Additionally, DNA is negatively charged, thus cationic ENMs are more likely to interact with the genetic material [168]. For example, [169] analysed the effect of surface charge on toxicity and showed that positively charged polystyrene NPs (NH₂-PS) displayed a higher cytotoxicity than negatively charged (COOH-PS) particles in HeLa and NIH 3T3 cells. Moreover, the NH₂-PS particles caused DNA damage and the activation of checkpoints whereas the COOH-PS had no obvious effect on the cell cycle. Moreover, [170] assessed the role of surface charge of NPs on *in vitro* developmental toxicity, by determining the effects of positively or negatively charged polystyrene nanoparticles (PS-NPs) in the embryonic stem (ES-D3) cell

differentiation assay. They concluded that the negatively charged PS-NPs did not affect ES-D3 cell differentiation, whereas the positively charged PS-NPs showed a concentration-dependent inhibition of ES-D3 cell differentiation, indicating that the effects of NPs on ES-D3 cell differentiation may depend on their surface charge. Finally, [171] studied the impact of surface charge to the pro-inflammatory and pro-fibrogenic effects of carbon nanotubes (CNTs), using a library of covalently functionalized multiwall carbon nanotubes (f-MWCNTs) established from the same starting material. Based on results of both *in vitro* and *in vivo* studies, the researchers concluded that the hazard ranking was: cationic functionalized-CNT > neutral functionalized-CNT > anionic functionalized-CNT. Positively charged cationic nanoparticles were shown to internalize more rapidly into cells than negatively charged anionic counterparts due to enhanced attachment to the anionic hydrophilic outer surface of cells [161, 172].

3.3.4 Effect of nanomaterial chemical composition on reactivity

Besides ENMs properties discussed above, other parameters such as the chemical composition can induce biological effects. Indeed, studies highlight that the composition of ENMs plays a distinct role in the cellular response. [173] evaluated the toxicity of similarly sized silver, copper, aluminum, nickel, cobalt and titanium dioxide NPs and their corresponding soluble salts, using zebrafish, daphnids, and algal species as models of various trophic levels. The authors found that nanosilver and nanocopper with their soluble forms caused toxicity in all tested organisms, however, titanium dioxide (TiO₂) of the same dimensions did not show any toxicity issues. Thus, particles composition seem to be important in determining the toxicities of NPs. In a study by [174] using three model cell lines representing different physiological compartments and nanomaterials of different compositions (TiO₂ and SiO₂ nanoparticles, and multi-wall carbon nanotubes [MWCNTs]) with differing size (MWCNTs of different diameters < 8 nm, 20-30 nm> 50 nm; but same length 0.5-2 μm) to analyze the effects of composition on toxicity to 3T3 fibroblasts, RAW 264.7 macrophages, and telomerase-immortalized (hT) bronchiolar epithelial cells. The results indicated that ENMs exposure induce cell specific responses: cytotoxicity, generation of reactive oxygen species, lysosomal membrane destabilization and mitochondrial permeability. The authors concluded that the composition and size of nanomaterials as well

as the target cell type are critical determinants of intracellular responses, degree of cytotoxicity and potential mechanisms of toxicity.

3.1.5 Effect of nanomaterial crystal structure on reactivity (crystallinity)

The crystalline phase of ENMs has also been shown to influence cellular toxicity. The relation between different crystal forms and toxicity has been relatively well established in the case of titanium dioxide (TiO₂). Various forms of TiO₂ ENMs can have different crystal structures (rutile or anatase or combinations of the 2 forms). Rutile TiO₂ is the most common natural form, whereas anatase and brookite are rarer forms, although the anatase form can often be found in synthetic TiO₂, especially as nanoparticles [175]. For instance, [176] investigated the effect of crystallinity on ENMs activity by comparing the potency between anatase and rutile TiO₂ ENMs to induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. They reported that rutile TiO₂ ENMs induce oxidative DNA damage, lipid peroxidation, and micronuclei formation in the absence of photocatalysis, whereas anatase ENMs of the same size and chemical composition are inert. The anatase–rutile mixture induced more oxidative DNA damage than the pure anatase and rutile forms. On the other hand, in an *in vitro* study of [177], human lung epithelial cells (A549) and human dermal fibroblasts has been exposed to similar-sized rutile and anatase TiO₂ ENMs. The study found that anatase TiO₂ ENMs were more biologically active and were 100 times more toxic than rutile TiO₂ in terms of cytotoxicity or oxidative DNA. The greater cytotoxic responses of anatase TiO₂ ENMs were attributed to a higher production of reactive oxygen species due to a superior photocatalyst (UV illumination) of the anatase crystal phase. [178] have also shown that the crystal structure of TiO₂ ENMs can have a significant impact on particle toxicity. Anatase TiO₂ was found to be more potent than the rutile form of the material. Mixtures of anatase and rutile TiO₂ had an intermediate potency. However, it is important to note that none of these studies examined size with the crystal structure composition controlled for or examined crystal structure while controlling the primary nanoparticle size. Thus, recently it was demonstrated that 100% anatase nanoparticles, regardless of size, induce cell necrosis and membrane leakage, but they do not generate ROS. In contrast, the rutile nanoparticles initiate apoptosis through formation of ROS. Therefore, it seems that links between size and crystal structure may have a role in mediating nanoparticle toxicity [179, 180].

3.3.6 Effect of nanomaterial aggregation state

The state of particle aggregation of ENMs plays an important role in determining their environmental transport, fate (e.g. mobility, fugacity, non-transient (sink) or transient source), behaviour (e.g. dissolution, aggregation, disaggregation) and biological effects [181, 182]. Aggregation of ENMs appears to be a ubiquitous phenomenon among all ENMs which are typically engineered to remain kinetically stable; however, in environmental and toxicological media, ENMs are prone to aggregation [183]. Basically, the aggregation states of ENMs depend on size, surface charge, and composition among others [123]. For example, [184] presented the first study on the developmental toxicity of settled of nanoscale zinc oxide particles (nZnO) aggregates, which can potentially be released into an aquatic environment. Researchers examined the sedimentation of nZnO in zebrafish culture medium and assessed the toxicity of settled nZnO aggregates on developing zebrafish embryos and larvae. Given the known dissolution of nZnO particles to release Zn^{2+} , they also assessed the toxic effect of soluble Zn^{2+} in this organism. The results showed that nZnO exerts dose-dependent toxicity to zebrafish embryos and larvae, causing malformation in the cardiovascular system, and blocking hatching, leading to mortality in some embryos. They speculated that the nZnO toxicity observed may be attributed to the combined effect of both Zn^{2+} and nZnO particles. This combination may contribute to the embryonic toxicity, possibly by increasing reactive oxidative species (ROS) and/or compromising the cellular oxidative stress response. Interestingly, the researchers demonstrated that one type of formulated sediments could mitigate the toxicity of nZnO aggregates, highlighting a possible countermeasure to reduce the adverse impact of nZnO aggregates on the environment. Because agglomeration could affect important physicochemical features, such as particle size and the size distribution, the biological effects of these changes should be identified to avoid incorrect estimation of the toxic potential of ENMs.

In the sequel, hence, a detailed introduction regarding the most commonly used *in vitro* assessment techniques for nanotoxicology is given in the succeeding sections.

3.2 Selection Criteria of *in vitro* tests

The testing of ENMs for potential toxicity is an area of continued growth and refinement and adverse effects of ENMs can be investigated through different approaches. These include

epidemiology studies, human clinical studies, animal studies, and *in vitro* studies (see Figure 1). This paper will especially focus *on in vitro* assessment of ENMs toxicity because *in vitro* tests can generate reproducible results as quickly as possible at an affordable cost for industrialists (see Table 2). It is one of the important and pertinent methods to investigate the toxicity of ENMs in absence of any clear guideline(s) by the regulatory agencies on the testing/evaluation of ENMs [121]. Indeed, the first step towards understanding how an agent will react in the body often involves cell-culture studies. They provide a rapid, simple and effective means of gathering preliminary toxicity data which is also cost effective with minimal ethical issues concerns by reducing the number of laboratory animals required for testing compared to *in vivo* studies [116, 185, 186]. There are a wide variety of *in vitro* assays for assessing the potential toxicity of ENMs: proliferation assay, apoptosis assay, necrosis assay, oxidative stress assay and DNA damage assays [187]. Utility of *in vitro* assays has been demonstrated in assessment of pulmonary hazards due to fine and nanoscale materials [188, 189]. However, the extension of results from *in vitro* experiments for the prediction of *in vivo* toxicity is problematic [134]. [188, 190] found little correlation between *in vivo* and *in vitro* toxicity results, especially with using ENMs. Toxic responses were observed for ENMs *in vitro* but the same results were not exactly reproduced *in vivo*. One possible reason for this discrepancy may be due to the *in vitro* exposure conditions which usually feature much higher concentrations and exposure times than found in the cellular environment *in vivo* [116]. Moreover [191] looked for the relationship between *in vitro* and *in vivo* results of inhalation studies and possible human occupational exposure to AgNPs. They calculated that a concentration of 10 µg/mL of AgNPs (20 nm) would approximately correspond to the total cellular deposition following 74 working weeks (8 h per day, 5 days per week). Thus, the doses used should be considered high but likely possible to be reached following long time of exposure, or after acute accidental exposure.



Figure 1: A hierarchy of scientific evidence for evaluation of nanomaterials' toxicity

Table 2: Relevant biological tests of ENMs

Toxicological testing of nanomaterials
Proliferation assays
Apoptosis assays
Necrosis Assays
Oxidative Stress Assay
Inflammatory Assay
DNA damage

In the following section, we will propose a new hazard assessment approach for safe handling and use of ENMs based on the physico-chemical and biological tests of the ENMs in the absence of ENMs-specific occupational exposure limits (OELs) or even of indicative data that are not imposed by regulation.

3.3 Development of hazard matrix tool

The present method is based on the “control banding (CB)” approach used in the industry for several decades and suggested as a pragmatic approach to manage the potential health risk resulting from exposure to ENMs. An exhaustive literature review about CB approach was performed in our previous paper [131]. After reviewing the CB tools that have been developed specifically for ENMs, all of these tools are qualitative in nature and are based on the exposure. More specifically, all of the hazard criteria used in these different CB methods that were evaluated during this literature review missed the point of really characterising the ENMs based on their major characteristics.

The new method proposed during the current work did not take exposure into consideration at this step. This approach is based exclusively on relevant physical, chemical and biological

characteristics of ENMs. The levels of toxicological hazards used in the current method will combine six physico chemical characteristics and five toxicological tests previously selected. The combination of these hazard bands will lead to the development of a decision matrix tool to establish a control hazard level (see table3), and then to make recommendations for the workers who handle hazardous chemicals such as ENMs and for members of the general population who might be exposed in the workplace.

Table 3: Assessment tool of nanoparticles (NPs) based on physico-chemical and biological characteristics: physico-chemical and biological characterization

Physicochemical Biological	Size		Shape			Surface charge			Chemical composition			Crystallinity		Aggregation state	
	<i>NPs < 10nm</i>	<i>10nm ≥ NPs ≥ 100nm</i>	<i>rod</i>	<i>spherical</i>	<i>helical</i>	<i>Negatively Charged</i>	<i>Neutral Charged</i>	<i>Positively Charged</i>	<i>Carbon based NPs</i>	<i>Inorganic NPs</i>	<i>Organic NPs</i>	<i>Amorphous</i>	<i>Crystalline</i>	<i>100nm > NPs ≥ 200m</i>	<i>200nm > NPs ≈ 1000nm</i>
Apoptosis assays -Membrane structure -Esterase activity / -membrane integrity	HL4	HL1	HL3	HL2	HL2	HL3	HL2	HL2	HL2	HL1	HL1	HL1	HL2	HL1	HL4
Necrosis Assays - Membrane integrity	HL3	HL2	HL4	HL2	HL3	HL4	HL3	HL3	HL2	HL1	HL1	HL1	HL2	HL1	HL3
Oxidative Stress Assay -Presence of reactive oxygen species (ROS) -Lipid peroxidation -Presence of lipid hydroperoxides -Antioxidant depletion -Superoxide dismutase (SOD) activity	HL2	HL4	HL1	HL1	HL3	HL1	HL1	HL4	HL3	HL4	HL3	HL3	HL4	HL4	HL1
Inflammatory Assay	HL1	HL3	HL2	HL1	HL4	HL2	HL1	HL3	HL4	HL3	HL4	HL4	HL3	HL3	HL2
DNA damage -DNA fragmentation -DNA double-strand breakage	HL1	HL1	HL4	HL1	HL4	HL1	HL4	HL4	HL1	HL2	HL2	HL2	HL1	HL2	HL4

Color Key of Toxicity category rating: H4: Hazard level **red** =Toxicity category I is Highly toxic; H3: Hazard level **orange**= Toxicity category II is Moderately toxic; H2: Hazard level **yellow**= Toxicity category III is Slightly toxic; H1: Hazard level **green** =Toxicity category IV is Practically non-toxi

4. Discussion

The present work is part of a project concerned with certification of nanomaterials in partnership with Evaluators of Health Risks. The first phase of this project involved the development of an assessment tool of ENMs, based on the National Research Council's (NRC's) approach in the publication titled "Integrated Approach to Design and Safe Handling of Nanomaterials—A Program Based on a Dialogue Between Industry and Evaluators of Health Risks," which was published on the Web site for IRSST [90]. The second phase of this project was an exhaustive literature review about CB approach and the main CB strategies which have been proposed world-wide [131]. The objectives of the literature review were to understand the CB tool and to understand the history of its development and how the CB tool has evolved over time. A new control banding method based on physico-chemical and biological characteristics of ENMs have been proposed after the literature review. In this current paper, we selected the appropriate physico-chemical and biological table 3 tests to standardize decision matrix tool.

The results of the literature review demonstrate that appropriate physicochemical characterization of ENMs along with toxicity assay selection is of utmost importance as they provide the foundation for systematic nanotoxicity studies. Because the field of nanotoxicity is relatively new and the specific ENMs properties that influence cellular toxicity are still not fully understood, a thorough characterization of the nanoparticle is essential. However, exhaustive characterization of ENMs is undoubtedly costly and time-consuming, and therefore, a sufficient but practical approach is needed. Thus, as presented in this paper, there is some agreement about the basic properties of ENMs that should, at a minimum, be considered to deserve characterization before conducting toxicity tests to ensure thorough toxicity studies that produce sound conclusions. On the other hand, it was important to focus only on the *in vitro* assessment of ENMs toxicity given that the assessment of defined toxicity endpoints by this method is more rapid and economical as compared to animal studies, which will resolve budget issue regarding application in the industry.

It is important to remember that goal of this semi-quantitative method is not intended to be a substitution of existing methods developed by other agencies which currently in use to

manage the hazards posed by chemicals. The present method aims to provide a tool that uses an original hazard assessment method to compare the physico-chemical and biological characteristics of ENMs and thus allow risk assessors to establish causal relationships between hazard and effects. After reviewing the relevant studies of physicochemical properties of nanomaterials having significant role on *in vitro* toxicity, we classified ENMs into different classes based on the one hand on their physico-chemical properties: shapes, sizes, chemical compositions, surface charges, crystallinity, aggregation and their biological characteristics on the other hand. The toxicological testing of ENMs selected for this new Control banding method is the most commonly used *in vitro* assessment assays, which generally, either evaluate viability (live/dead ratio) or toxicity mechanism. The major viability assays based are organized into the categories of proliferation, necrosis or apoptosis, and the major toxicity mechanism analyses are categorized as either oxidative stress or DNA damage detection techniques. This selection is not intended to be an exhaustive review of toxicological methodology, rather it is a selection of common *in vitro* toxicological techniques used in the assessment of nanotoxicity. Finally, the proposed method discussed in this paper will require validation before it can be used as a semi-quantitative CB approach. Effectively, a validation will be required before a decision is made regarding the prioritisation of tests to be used to characterise the hazards. Thus, the validation component will be explored during the next phase of the project and will not include in this current work.

5. Conclusion

In conclusion, a new semi-quantitative methodology of control banding is proposed for the hazard assessment based on physico-chemical and biological characteristics of ENMs. In this paper, the results of the literature review enabled us to understand the possible correlation between physicochemical properties of ENMs with their toxic effects by selecting the appropriate physico-chemical and biological characterisation tests. Subsequently, an evaluation grid for nanomaterials was presented.

In particular, this hazard assessment method is original because it is dependent upon the structure of ENMs and It does not account for exposure factor on the first intend. It is important to develop this CB approach based on the characterisation of potential health hazards posed by ENMs to identify and quantify their degree of hazardousness to establish a better framing of their health implications and to ensure safe handling of these nanoparticles.

At this point, the limitation of this method is that all tests suggested in this paper must be validated before a decision is made regarding the prioritisation of tests to be used for characterising the hazards. This limitation corresponds to Step 3 of our project concerned with certification of nanomaterials in partnership with Evaluators of Health Risks.

6. References

1. Marquis, B.J., et al., *Analytical methods to assess nanoparticle toxicity*. *Analyst*, 2009. **134**(3): p. 425-439.
2. Elzey, S.R., *Applications and physicochemical characterization of nanomaterials in environmental, health, and safety studies*. 2010: The University of Iowa.
3. Li, X., et al., *Effects of physicochemical properties of nanomaterials on their toxicity*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2015. **103**(7): p. 2499-2507.
4. Rose, J., et al., *Physicochemical Properties of Nanoparticles in Relation with Toxicity*, in *Encyclopedia of Nanotechnology*, B. Bhushan, Editor. 2012, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 2085-2085.
5. Navya, P.N. and H.K. Daima, *Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives*. *Nano Convergence*, 2016. **3**(1): p. 1.
6. Arora, S., J.M. Rajwade, and K.M. Paknikar, *Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012. **258**(2): p. 151-165.
7. Pedata, P., et al., *Immunotoxicological impact of occupational and environmental nanoparticles exposure: The influence of physical, chemical, and combined characteristics of the particles*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2015. **29**(3): p. 343-353.
8. Gattoo, M.A., et al., *Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations*. *BioMed Research International*, 2014. **2014**: p. 8.
9. Martirosyan, A. and Y.-J. Schneider, *Engineered Nanomaterials in Food: Implications for Food Safety and Consumer Health*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2014. **11**(6): p. 5720-5750.
10. Oksel, C., et al., *(Q)SAR modelling of nanomaterial toxicity: A critical review*. *Particuology*, 2015. **21**(Supplement C): p. 1-19.
11. Oberdorster, G., et al., *Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy*. *Part Fibre Toxicol*, 2005. **2**: p. 8.
12. Jiang, J., G. Oberdörster, and P. Biswas, *Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2009. **11**(1): p. 77-89.
13. Porredon Guarch, C., et al., *Basis for the toxicological evaluation of engineered nanomaterials*. *Revista de Toxicología*, 2014. **31**(1).
14. Iavicoli, I., et al., *Assessment of occupational exposure to engineered nanomaterials in research laboratories using personal monitors*. *Science of The Total Environment*, 2018. **627**: p. 689-702.
15. Card, J.W. and B.A. Magnuson, *A method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials*. *International journal of toxicology*, 2010. **29**(4): p. 402-410.
16. Dimou, K. and C. Emond, *Nanomaterials, and Occupational Health and Safety—A Literature Review About Control Banding and a Semi-Quantitative Method Proposed for Hazard Assessment*. 2017.

17. OECD., *Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD's Sponsorship Programme*. Paris, France: ENV/JM/MONO(2009)20/REV, *Organization for Economic Co-operation and Development*. 2010.
18. Elsaesser, A. and C.V. Howard, *Toxicology of nanoparticles*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012. **64**(2): p. 129-137.
19. Rivera Gil, P., et al., *Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future*. *ACS nano*, 2010. **4**(10): p. 5527-5531.
20. Warheit, D.B., et al., *Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2008. **120**(1): p. 35-42.
21. Oberdörster, E. Oberdörster, and J. Oberdörster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. *Environmental health perspectives*, 2005. **113**(7): p. 823-839.
22. Bouwmeester, H., et al., *Minimal analytical characterization of engineered nanomaterials needed for hazard assessment in biological matrices*. *Nanotoxicology*, 2011. **5**(1): p. 1-11.
23. Powers, K.W., P.L. Carpinone, and K.N. Siebein, *Characterization of nanomaterials for toxicological studies*. *Nanotoxicity: Methods and Protocols*, 2012: p. 13-32.
24. Pettitt, M.E. and J.R. Lead, *Minimum physicochemical characterisation requirements for nanomaterial regulation*. *Environment International*, 2013. **52**(Supplement C): p. 41-50.
25. Oomen, A.G., et al., *Concern-driven integrated approaches to nanomaterial testing and assessment – report of the NanoSafety Cluster Working Group 10*. *Nanotoxicology*, 2014. **8**(3): p. 334-348.
26. Ivask, A., et al., *Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro*. *PloS one*, 2014. **9**(7): p. e102108.
27. Park, M.V.D.Z., et al., *The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles*. *Biomaterials*, 2011. **32**(36): p. 9810-9817.
28. Kim, T.-H., et al., *Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012. **100A**(4): p. 1033-1043.
29. Zapór, L., *Effects of silver nanoparticles of different sizes on cytotoxicity and oxygen metabolism disorders in both reproductive and respiratory system cells*. *Archives of Environmental Protection*, 2016. **42**(4): p. 32-47.
30. INAIL., *Italian Workers' Compensation Authority (INAIL) White Book, Exposure to Engineered Nanomaterials and Occupational Health and Safety Effects*. 2011: p. 211.
31. NIOSH., *Filling the Knowledge Gaps for Safe Nanotechnology in the Workplace. A Progress Report from the NIOSH Nanotechnology Research Center, 2004–2011*. 2012.
32. Warheit, D.B., et al., *Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties*. *Toxicology*, 2007. **230**(1): p. 90-104.

33. Karlsson, H.L., et al., *Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size*. Toxicology Letters, 2009. **188**(2): p. 112-118.
34. Bakand, S. and A. Hayes, *Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles*. International Journal of Molecular Sciences, 2016. **17**(6): p. 929.
35. Shin, S.W., I.H. Song, and S.H. Um, *Role of physicochemical properties in nanoparticle toxicity*. Nanomaterials, 2015. **5**(3): p. 1351-1365.
36. Holgate, S.T., *Exposure, uptake, distribution and toxicity of nanomaterials in humans*. Journal of biomedical nanotechnology, 2010. **6**(1): p. 1-19.
37. Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C.W. Chan, *Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells*. Nano Letters, 2006. **6**(4): p. 662-668.
38. Mahmoudi, M., et al., *Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle*. Chemical Reviews, 2011. **111**(5): p. 3407-3432.
39. Xie, X., et al., *The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 3827.
40. Sharifi, S., et al., *Toxicity of nanomaterials*. Chemical Society reviews, 2012. **41**(6): p. 2323-2343.
41. Wang, S., et al., *Challenge in Understanding Size and Shape Dependent Toxicity of Gold Nanomaterials in Human Skin Keratinocytes*. Chemical physics letters, 2008. **463**(1-3): p. 145-149.
42. Shvedova, A., et al., *Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2003. **66**(20): p. 1909-1926.
43. Monteiro-Riviere, N.A., et al., *Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes*. Toxicology letters, 2005. **155**(3): p. 377-384.
44. Poland, C.A., et al., *Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study*. Nature Nanotechnology, 2008. **3**: p. 423.
45. Girardello, R., et al., *Cellular responses induced by multi-walled carbon nanotubes: in vivo and in vitro studies on the medicinal leech macrophages*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 8871.
46. Xu, X. and M.A. Khan, *Regulatory Perspective on the Development of Polymer Nanomaterials*, in *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines: A Guide for their Design, Preparation and Development*, C. Vauthier and G. Ponchel, Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 615-633.
47. Fröhlich, E., *The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles*. International journal of nanomedicine, 2012. **7**: p. 5577.
48. He, C., et al., *Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Biomaterials, 2010. **31**(13): p. 3657-3666.
49. El Badawy, A.M., et al., *Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles*. Environmental science & technology, 2010. **45**(1): p. 283-287.

50. Ha, M.K., et al., *Toxicity Classification of Oxide Nanomaterials: Effects of Data Gap Filling and PChem Score-based Screening Approaches*. Scientific Reports, 2018. **8**: p. 3141.
51. Pietroiusti, A., et al., *Low Doses of Pristine and Oxidized Single-Wall Carbon Nanotubes Affect Mammalian Embryonic Development*. ACS Nano, 2011. **5**(6): p. 4624-4633.
52. Hoshino, A., et al., *Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification*. Nano Letters, 2004. **4**(11): p. 2163-2169.
53. Nel, A.E., et al., *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. Nature materials, 2009. **8**(7): p. 543-557.
54. Singh, N., et al., *NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials*. Biomaterials, 2009. **30**(23): p. 3891-3914.
55. Liu, Y., et al., *Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes*. Biomaterials, 2011. **32**(32): p. 8291-8303.
56. Kloet SK, et al., *Assessment of the potential developmental toxicity of positively and negatively charged polystyrene nanoparticles using the embryonic stem cell differentiation assay. In vitro assays for hazard identification of nanoparticles 2016*.
57. Li, R., et al., *Surface Charge and Cellular Processing of Covalently Functionalized Multiwall Carbon Nanotubes Determine Pulmonary Toxicity*. ACS Nano, 2013. **7**(3): p. 2352-2368.
58. Zhu, M., et al., *Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate*. Accounts of Chemical Research, 2013. **46**(3): p. 622-631.
59. Griffitt, R.J., et al., *Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008. **27**(9): p. 1972-1978.
60. Sohaebuddin, S.K., et al., *Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent*. Particle and Fibre Toxicology, 2010. **7**(1): p. 22.
61. Luyts, K., et al., *How physico-chemical characteristics of nanoparticles cause their toxicity: complex and unresolved interrelations*. Environmental Science: Processes & Impacts, 2013. **15**(1): p. 23-38.
62. Gurr, J.-R., et al., *Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells*. Toxicology, 2005. **213**(1): p. 66-73.
63. Sayes, C.M., et al., *Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells*. Toxicological Sciences, 2006. **92**(1): p. 174-185.
64. Jiang, J., et al., *Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase?* Nanotoxicology, 2008. **2**(1): p. 33-42.
65. Auffan, M., et al., *Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective*. Nature nanotechnology, 2009. **4**(10): p. 634.

66. K. Braydich-Stolle, L., et al., *Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity*. Vol. 11. 2009. 1361-1374.
67. Baalousha, M., et al., *EN15142 the concentration-dependent behaviour of nanoparticles*. Environmental Chemistry, 2016. **13**(10.1071).
68. Chen, Y., Y. Huang, and K. Li, *Temperature effect on the aggregation kinetics of CeO₂ nanoparticles in monovalent and divalent electrolytes*. J. Environ. Anal. Toxicol, 2012. **2**(7): p. 158-162.
69. Albanese, A. and W. C.W. Chan, *Effect of Gold Nanoparticle Aggregation on Cell Uptake and Toxicity*. Vol. 5. 2011. 5478-89.
70. Zhu, X., et al., *The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (Danio rerio)*. Nanotechnology, 2009. **20**(19): p. 195103.
71. Lewinski, N., V. Colvin, and R. Drezek, *Cytotoxicity of Nanoparticles*. Small, 2008. **4**(1): p. 26-49.
72. Mahmoudi, M., et al., *A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 300-309.
73. Stone, V., H. Johnston, and R.P.F. Schins, *Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations*. Critical Reviews in Toxicology, 2009. **39**(7): p. 613-626.
74. Sayes, C.M., et al., *Can in vitro assays substitute for in vivo studies in assessing the pulmonary hazards of fine and nanoscale materials?* Journal of Nanoparticle Research, 2009. **11**(2): p. 421-431.
75. Warheit, D., C. Sayes, and K. Reed, *Nanoscale and fine zinc oxide particles: can in vitro assays accurately forecast lung hazards following inhalation exposures?* Environmental science & technology, 2009. **43**(20): p. 7939-7945.
76. Sayes, C.M., K.L. Reed, and D.B. Warheit, *Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles*. Toxicological sciences, 2007. **97**(1): p. 163-180.
77. Wang, X., et al., *Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential*. Small, 2014. **10**(2): p. 385-398.
78. Emond, C., S. Kouassi, and F. Schuster, *Approche intégrée pour une conception et une manipulation sécuritaires des nanomatériaux - Un programme basé sur une concertation entre l'industrie et des évaluateurs des risques sanitaires. R-877 , 1-35. 2015. (Report)*. 2015.

CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

L'objectif général de ce mémoire était de développer une approche novatrice de Control Banding basée sur les principaux paramètres physico-chimiques et biologiques des NMs afin de mieux caractériser et quantifier leur réactivité pour un meilleur encadrement de leurs impacts sanitaires et une manipulation plus sécuritaire. Nous nous étions fixés comme sous-objectifs : 1) faire un état de l'art des 20 dernières années sur l'approche Control Banding, ainsi qu'une description et une comparaison des forces et faiblesses des principaux outils de CB développés jusqu'à présent pour les nanomatériaux, 2) identifier les principaux paramètres physico-chimiques des nanomatériaux influant leur activité biologique dans une perspective d'établir des corrélations et de standardiser la grille conçue, et 3) proposer une approche semi-quantitative d'évaluation des dangers basée sur les paramètres physico-chimiques et de toxicité des nanomatériaux pour mieux caractériser leur niveau de dangerosité.

D'abord, en ce qui a trait à l'analyse exhaustive d'une centaine de textes provenant de la littérature scientifique, celle-ci a permis de mettre en évidence des lacunes importantes dans les études portant sur la caractérisation du danger des nanomatériaux basée sur leurs paramètres physico-chimiques et subséquentement sur l'approche du Control Banding qui sont malheureusement absentes ou incomplètes. Cela est surprenant étant donné l'importance de l'influence des caractéristiques physicochimiques sur les effets biologiques des nanomatériaux. Les six modèles de Control Banding (**CB Nanotool (USA)**, **Swiss Precautionary Matrix (Switzerland)**, **ANSES CB Nanotool (France)**, **NanoSafer CB tool (Danish)**, **IVAM Guidance (Dutch)**, **Stoffenmanager Nano (Holland)**) développés jusqu'à présent sont des approches pratiques pour évaluer les risques liés aux nanomatériaux sur les différents lieux de travail en choisissant des mesures de corrections appropriées. Chacune de ces méthodes a été conçue à des fins différentes mais elles visent essentiellement à aider les petites et moyennes entreprises n'ayant pas de ressources ou de savoir-faire interne dans le domaine de la santé et sécurité au travail. Certaines d'entre elles ont été développées davantage dans le but d'appliquer une approche de précaution afin de déterminer s'il y a nécessité d'une évaluation ultérieure plus approfondie (Swiss Precautionary Matrix). D'autres, ont été développées dans le but de protéger les chercheurs manipulant les nanomatériaux au sein des laboratoires (CB Nanotool), ou de fournir un guide conçu spécifiquement pour les travailleurs manipulant les nanomatériaux (IVAM Guidance) ou

encore dans le but d'évaluer et de gérer les risques professionnels pour les différents milieux de travail (ANSES CB Nanotool). ANSES CB Nanotool, Stoffenmanager Nano et IVAM Guidance sont les outils les plus robustes. L'utilisation du CB Nanotool et ANSES CB Nanotool requiert une expertise spécifique, alors que Stoffenmanager Nano et IVAM ne nécessite pas d'expertise ou d'accompagnement quant à l'évaluation du processus du Control Banding. Bien que la portée et les objectifs de ces approches varient considérablement, elles fournissent des informations intéressantes pour une première évaluation des expositions et des risques liés à la production et l'utilisation des nanomatériaux. Toutes les approches développées auparavant sont de nature qualitative, en réponse à une exposition. Elles ne sont pas convergentes d'où la nécessité d'une harmonisation et validation des différents modèles existants. De plus, ces modèles sont très rarement utilisés et restent encore du domaine de la recherche ou à un usage très restreint au sein de l'agence qui l'a développé. Les connaissances quant aux aspects de santé et de sécurité relatifs aux nanomatériaux sont en constante évolution, il est donc important d'intégrer ces nouvelles données dans les méthodes de Control Banding utilisés. Cela contribuera à l'amélioration de ces approches permettant une évaluation de plus en plus semi quantitative. En ce qui concerne l'approche développée dans ce mémoire celle-ci diffère beaucoup de celles indiquées ci-dessus. En effet, Il s'agit d'un outil objectif d'évaluation et de caractérisation à des fins de recommandation pour tous les intervenants (préventeurs, responsables de la santé-sécurité des travailleurs et des consommateurs). L'intérêt ici est d'évaluer les nanoparticules comme entités pour mieux connaître leur degré de dangerosité. Ceci permettra de conseiller l'industriel sur les précautions à prendre pour la protection des travailleurs et de la population générale lors de la génération de nanomatériaux ainsi que de porter un jugement sur les limitations d'usage des nanoparticules évaluées.

En ce qui a trait aux paramètres physico-chimiques des nanomatériaux influant leur activité biologique, la revue de la littérature a permis de confirmer que la caractérisation physico-chimique des nanomatériaux est une étape essentielle en nanotoxicologie. La revue de la littérature a montré également que la sélection des tests de caractérisation chimique et biologique appropriée est une autre étape aussi importante que celle de la caractérisation pour déterminer les effets des nanomatériaux sur la santé.

Dans ce travail on s'est intéressé principalement à la caractérisation du nanomatériau comme entité ayant un potentiel de dangerosité vis-à-vis du matériel biologique. Nous avons répertorié les nanomatériaux d'une part selon leurs propriétés physico-chimique: forme, taille, composition chimique, charge de surface, cristallinité, agrégation et d'autre part sur leur réactivité biologique basée sur des résultats de tests *in vitro*. Les tests biologiques évalués dans cette nouvelle méthodologie sont les tests *in vitro* les plus couramment utilisés dans les études des nanotechnologies, pour évaluer généralement soit la viabilité (rapport morts/vivants) ou le mécanisme de toxicité. Les principaux tests de viabilité sont les tests de prolifération, de nécrose ou d'apoptose, et les analyses des principaux mécanismes de toxicité sont les techniques de détection du stress oxydatif ou des lésions de l'ADN. Cette énumération ne se veut pas une liste exhaustive, mais plutôt une sélection de tests *in vitro* essentiels dans la caractérisation des dangers des nanomatériaux. La préférence donnée ici aux tests *in vitro* se justifie par le souci d'obtenir une réponse sur la réactivité à faible coût pour que l'industriel n'endosse aucun compromis mettant en péril la santé et la sécurité des travailleurs. En effet, étant donné que la caractérisation exhaustive des nanomatériaux est longue et coûteuse, il était important d'identifier un minimum de tests pouvant générer le maximum d'informations. La sélection des tests *in vitro* est faite dans une perspective de standardisation de l'approche proposée dans ce travail, néanmoins, l'extension des résultats d'expériences *in vitro* pour la prédiction de la toxicité *in vivo* est problématique. Une des raisons possibles de cette problématique peut être due aux conditions d'exposition *in vitro*, qui présentent généralement des concentrations et des temps d'exposition beaucoup plus élevés que ceux rencontrés dans les essais *in vivo*.

En ce qui a trait à l'approche proposée dans ce travail, le développement d'une approche semi-quantitative permettant de quantifier la caractérisation du danger sur la base des paramètres physico-chimiques et des tests biologiques des nanomatériaux était important étant donné que les modèles de Control Banding proposés à date sont tous de nature qualitative et basés sur l'exposition. La nouvelle méthode développée n'a pas pris en compte l'exposition dans un premier temps. Elle repose exclusivement sur les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques pertinentes des nanomatériaux. Dans cette évaluation on s'intéresse dans un premier temps à la caractérisation du danger des nanomatériaux dans le but de regrouper les nanomatériaux en fonction de leurs propriétés spécifiques. Une fois

que le danger est identifié, la caractérisation sur la base de l'exposition potentielle constituera un aspect de la démarche d'évaluation des risques qui n'a pas été abordé dans ce travail. Cette approche diffère beaucoup de celle d'autres agences européennes, canadiennes ou américaines qui vont évaluer et caractériser l'exposition et le risque pour les travailleurs et travailleuses. Les niveaux de dangerosité utilisés dans la méthode actuelle combinent six caractéristiques physico-chimiques (taille, forme, charge de surface, cristallinité, chimie de surface, agrégation) et cinq tests toxicologiques (apoptose, mort cellulaire, stress oxydatif, inflammatoire, génotoxicité). La combinaison de ces bandes de risque a conduit à la mise au point d'un outil matriciel décisionnel constitué de 4 bandes de toxicité (rouge, orange, vert et jaune). Les codes de couleur des niveaux de danger nous permettent de se situer par rapport à une catégorie de toxicité spécifique (I, II, III et IV). Quand le niveau de danger est rouge, cela signifie qu'on est dans la catégorie de toxicité I qui est qualifié de hautement toxique pour la santé humaine. En revanche, quand le niveau de danger est vert, cela signifie qu'on est dans la catégorie de toxicité IV qui est qualifié de peu toxique. Ces niveaux de danger nous permettent de favoriser un développement sécuritaire des nanotechnologies ainsi que d'établir un niveau de risque de contrôle permettant de formuler des recommandations pour les travailleurs manipulant des produits chimiques dangereux tels que des nanomatériaux ainsi que la population en général. Enfin, la méthode proposée dans le présent travail nécessitera une validation par les pouvoirs publiques, les instances d'évaluation des produits et de la protection de la santé au travail avant de pouvoir être utilisée comme approche de CB semi-quantitative. Effectivement, une validation par les instances responsables sera nécessaire avant qu'une décision soit prise concernant la priorisation des tests à utiliser pour caractériser les dangers des nanomatériaux.

En conclusion, ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche portant sur le développement d'un outil de certification des nanomatériaux en partenariat avec les évaluateurs des risques sanitaires. La première phase de ce projet a consisté au développement d'un outil d'évaluation des risques des nanomatériaux en se basant sur le modèle d'évaluation des risques sanitaires des substances chimiques proposé par le National Research Council (NRC). Cette première phase a fait l'objet d'une publication intitulée « *Approche intégrée pour une conception et une manipulation sécuritaire des nanomatériaux. Un programme basé sur une concertation entre l'industrie et des évaluateurs des risques* ».

sanitaires » publié sur le site Web de l'IRSST [36]. La deuxième phase de ce projet consistait en une revue de littérature exhaustive sur l'approche de Control Banding ainsi que sur les principaux outils Control Banding développés pour les nanomatériaux [74]. La troisième phase du projet était de sélectionner les tests de caractérisation physico-chimiques et biologiques appropriés pour normaliser l'approche semi quantitative proposée dans ce travail. Une validation de cette méthode originale sera nécessaire par les industriels du secteur des nanotechnologies en partenariat avec les spécialistes en matière sanitaire avant qu'une décision soit prise concernant la priorisation des tests biologiques à utiliser pour caractériser les dangers des nanomatériaux. Cependant, la composante de validation sera explorée lors de la prochaine phase de ce projet dans une perspective de certification des produits nanotechnologiques. Rappelons que l'objectif de cette méthode semi-quantitative n'est pas de remplacer les méthodes existantes pour gérer les risques présentés par les produits chimiques mais vise à fournir un outil bio-physicochimique aux évaluateurs des risques sanitaires. Ceci dans une perspective de regrouper les nanomatériaux en fonction de leur dangerosité et leur réactivité afin assurer une meilleure évaluation par les instances publiques et une meilleure protection de la santé des travailleurs et in fine de la population générale.

Bibliographie

1. Lungu, M., et al., *Nanoparticles' Promises and Risks*. 2015.
2. Feynman R., *There's plenty of room at the bottom*, in *Feynman and computation*. 1959, CRC Press. p. 63-76.
3. Lintz, P., *Analyse et enjeux éthiques des nanotechnologies en médecine: temps et discours, approche éthique systémique: double discours, approche psychanalytique: complémentarité des discours entre science et théologie*. 2014, Université Paul Valéry-Montpellier III.
4. Binet, S., et al., *Les nanomatériaux manufacturés à l'horizon 2030 en France*. 2015, INRS.
5. National Nanotechnology Initiative, *Strategic plan - Strategy for Nanotechnology-Related Environmental, Health, and Safety Research* Édit Office NNC (National Science and Technology Council). 2011.
6. Luther W. and A. Zweck, *Safety aspects of engineered nanomaterials*. 2016: Pan Stanford.
7. Oberdörster, G., et al., *Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats*. 2002. **65**(20): p. 1531-1543.
8. Buzea, C., I.I. Pacheco, and K.J.B. Robbie, *Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity*. 2007. **2**(4): p. MR17-MR71.
9. Warheit, et al., *Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks*. 2008. **120**(1): p. 35-42.
10. Binet, S., et al., *Les nanomatériaux manufacturés à l'horizon 2030*. 2015, INRS.
11. Anses, *Méthode d'évaluation des niveaux de risques sanitaires et des dangers écotoxicologiques*. 2015.
12. Anses, *Enjeux et mise à jour des connaissances*. 2014.
13. Russell, R., et al., *An introduction to a UK scheme to help small firms control health risks from chemicals*. *Annals of Occupational Hygiene*, 1998. **42**(6): p. 367-376.
14. Paik, S.Y., D.M. Zalk, and P. Swuste, *Application of a pilot control banding tool for risk level assessment and control of nanoparticle exposures*. *The Annals of occupational hygiene*, 2008. **52**(6): p. 419.
15. Triolet, J. and M. Héry, *Les méthodes d'évaluation des risques chimiques. Une analyse critique*, 2009.
16. Riediker, M., et al., *Development of a Control Banding Tool for Nanomaterials*. 2012. **2012**.
17. Naumann, B.D. *Control banding in the pharmaceutical industry*. in *Occupational Hygienists Conference Proceedings*. 2005.
18. Taniguchi, N., C. Arakawa, and T. Kobayashi. *On the basic concept of 'nanotechnology'*. in *Proceedings of the International Conference on Production Engineering, 1974-8*. 1974. 一般社団法人日本機械学会.

19. Royal Society et Royal Academy of Engineering, *Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties*, . 2004(RS policy document 19/04,).
20. Maniet F., *L'encadrement juridique des nanotechnologies au Canada et dans l'Union européenne*. 2010.
21. ISO/TS27687, 2015.
22. ISO/TS80004-1, X., 2015.
23. REACH.
24. Santé Canada, 2011. Énoncé de politique sur la définition ad hoc de Santé Canada s'appliquant aux nanomatériaux
25. IRSST, *Nanomatériaux -Guide de Bonnes Pratiques Favorisant la Gestion des Risques en Milieu de Travail*. 2014, IRSST Montreal, QC, Canada.
26. CE, *Nanomaterials in REACH and CLP*. 2018.
27. CE, *Règlement (CE) No 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques (refonte) (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)*». Journal officiel de l'Union européenne, no. L 342, 22 décembre,, 2009: p. p. 59-209.
28. CE, *«Règlement (UE) No 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l' utilisation des produits biocides*». Journal officiel de l'Union européenne, no. L 167, 27 juin,, 2012: p. p. 1-123.
29. CE, *Règlement délégué (UE) No 1363/2013 de la Commission du 12 décembre 2013 modifiant le règlement (UE) no 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil concernant l' information des consommateurs sur les denrées alimentaires en ce qui concerne la définition des «nanomatériaux manufacturés»*. urnal officiel de l'Union européenne, no. L 343, 19 décembre 2013,, 2013: p. p. 26-28.
30. CE, *«Règlement (UE) 2015/2283 du Parlement européen et du Conseil du 25 novembre 2015 relatif aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) no 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) no 258/97 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) no 1852/2001 de la Commission*». Journal officiel de l'Union européenne, 22 novembre. En ligne. <<http://eurlex.europa.eu/legalcontent/FR/TXT/HTMLI?uri=CELEX:32015R2283>>. Consulté le 16-11-2018., 2015.
31. USEPA-Nanotechnology-White-Paper, *Nanotechnology White Paper*. 2007: p. 120.
32. Gleiter H., *Nanostructured materials: basic concepts and microstructure*. Acta Materialia, 2000. **48**(1): p. 1-29.
33. Gonçalves D., *Caracterisation des proprietes inflammatoires et des effets sur le neutrophile de nanoparticules de type oxyde-metal et des fullerenols*. 2015, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique.
34. Taylor D., *Dust in the wind*. Environmental health perspectives, 2002. **110**(2): p. A80-A87.
35. Oberdörster, E. Oberdörster, and J. Oberdörster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environmental health perspectives, 2005. **113**(7): p. 823-839.

36. Emond, S. Kouassi, and F. Schuster, *Approche intégrée pour une conception et une manipulation sécuritaires des nanomatériaux - Un programme basé sur une concertation entre l'industrie et des évaluateurs des risques sanitaires*. Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail, 2015. **R-877, 1-35. 2015. (Report). 2015.**
37. Anses, *Évaluation des risques liés aux nanomatériaux: enjeux et mise à jour des connaissances. Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective. Maisons-Alfort: Anses., 2014: p. 180 p.*
38. PEN, *Consumer products inventory: an inventory of nanotechnology-based consumer products introduced on the market. En ligne. <<http://www.nanotechproject.org/cpi/>>. Consulté le 16-11-2018. 2014a.*
39. WWICS, *The project on Emerging Nanotechnologies. www.nanotechproject.org/cpi/. 2017.*
40. NRC, *National Research Council. Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process. Washington, DC: National Academy Press. 1983.*
41. Aitken, R., et al., *EMERGNANO: A review of completed and near completed environment, health and safety research on nanomaterials and nanotechnology Defra Project CB0409. 2009.*
42. Affset, *Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement. 2010. 3: p. 1-207.*
43. OECD, *Nanosafety at the OECD: The first six years. En ligne. <<http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/>>. Consulté le 23-11-2018., 2013.*
44. Luther W., *Industrial application of nanomaterials : chances and risks technological analysis). VDI Technologiezentrum GERMANY. 2004.*
45. Lekeufack, D. and D. Elodie, *Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules d'or pour des applications en optique: perspective en photocatalyse. 2010, Lyon1.*
46. WWICS, *The project on Emerging Nanotechnologies. www.nanotechproject.org/cpi/. 2010.*
47. Maynard, A., D.B. Warheit, and M.A. Philbert, *The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, 2011. 120 Suppl 1(Suppl 1): p. S109-S129.*
48. Yang, W., J.I. Peters, and R.O.J.I.j.o.p. Williams III, *Inhaled nanoparticles—a current review. 2008. 356(1-2): p. 239-247.*
49. INRS, *Nanomateriaux: Prévention des risques dans les laboratoires. 2012, INRS.*
50. Auffan, M., *Nanoparticules d'oxydes métalliques: relations entre la réactivité de surface et des réponses biologiques. 2007, Université Paul Cézanne-Aix-Marseille III.*
51. Jiang, J., G. Oberdörster, and P.J.J.o.N.R. Biswas, *Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. 2009. 11(1): p. 77-89.*
52. Card, J.W. and B.A.J.I.j.o.t. Magnuson, *A method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials. 2010. 29(4): p. 402-410.*
53. Perreault, F., *Toxicité des nanoparticules métalliques chez différents modèles biologiques. 2012, Université du Québec à Montréal.*
54. Arora, S., et al., *Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. 2012. 258(2): p. 151-165.*

55. Lewinski, N., V. Colvin, and R.J.s. Drezek, *Cytotoxicity of nanoparticles*. 2008. **4**(1): p. 26-49.
56. Marquis, B.J., et al., *Analytical methods to assess nanoparticle toxicity*. 2009. **134**(3): p. 425-439.
57. Cohen, Y., et al., *In Silico Analysis of Nanomaterials Hazard and Risk*. Accounts of Chemical Research, 2013. **46**(3): p. 802-812.
58. Jayjock, M.A., J. Lynch, and D.I. Nelson, *Risk assessment principles for the industrial hygienist*. 2000: AIHA.
59. NIOSH, <*Qualitative Risk Characterization and Management of Occupational Hazards Control Banding (CB)-2.pdf*>. 2009.
60. Nelson, D.I. and D.M. Zalk, *Control banding: background, critique, and evolution*. Patty's Industrial Hygiene, 2001: p. 1263-1321.
61. National Institute for Occupational & Health, *Worker health chartbook, 2004*. 2004.
62. Skordal, K., *Control Banding Tools: Advanced Regulated Evaluation and Authorization of Chemicals Tool and Agreement with Professional Judgment*, M. Yost, J. Camp, and N. Seixas, Editors. 2012, ProQuest Dissertations Publishing.
63. Money C., *European experiences in the development of approaches for the successful control of workplace health risks*. 2003. **47**(7): p. 533-540.
64. Gardner, R. and P. Oldershaw, *Development of pragmatic exposure-control concentrations based on packaging regulation risk phrases*. 1991. **35**(1): p. 51-60.
65. Topping, M., C. Williams, and J.J.T.A.o.o.h. Devine, *Industry's perception and use of occupational exposure limits*. 1998. **42**(6): p. 357-366.
66. CAS, *CAS REGISTRY - The gold standard for chemical substance information*. A Division of The AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2019.
67. Drollet, D., et al., *Stratégies de diagnostic de l'exposition des travailleurs aux substances chimiques*. 2010.
68. Persoons R., *Etude des méthodes et modèles de caractérisation de l'exposition atmosphérique aux polluants chimiques pour l'évaluation des risques sanitaires*. 2011, Université de Grenoble.
69. Zalk, D. and D.I. Nelson, *History and evolution of control banding: a review*. Journal of occupational environmental hygiene, 2008. **5**(5): p. 330-346.
70. Ostiguy, C., et al., *Développement d'un outil de gestion graduée des risques spécifique au cas des nanomatériaux: rapport d'appui scientifique et technique*. 2011, Anses.
71. CCHST, *Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail : la gestion graduée des risques*. 2019.
72. Money, C.D., *European Experiences in the Development of Approaches for the Successful Control of Workplace Health Risks*. Annals of Occupational Hygiene, 2003. **47**(7): p. 533-540.
73. Maynard A., *Nanotechnology: The Next Big Thing, or Much Ado about Nothing?* The Annals of Occupational Hygiene, 2007. **51**(1): p. 1-12.
74. Dimou, K. and C. Emond. *Nanomaterials, and Occupational Health and Safety—A Literature Review About Control Banding and a Semi-Quantitative Method Proposed for Hazard Assessment*. in *Journal of Physics: Conference Series*. 2017. IOP Publishing.

75. Lungu, M., et al., *Nanoparticles' Promises and Risks*. 2015.
76. Feynman, R.P., *There's plenty of room at the bottom*. Miniaturization"(HD Gilbert, ed.) Reinhold, New York, 1961.
77. Camille, L.P., *Les nanotechnologies: Concepts et applications*. 2013: Lavoisier.
78. Drexler, K.E., *Engines of creation 2.0: the coming era of nanotechnology*. 2006.
79. Iavicoli, I., et al., *Opportunities and challenges of nanotechnology in the green economy*. Environmental Health, 2014. **13**(1): p. 1.
80. Luther, W. and A. Zweck, *Safety aspects of engineered nanomaterials*. 2013: CRC Press.
81. Ezema, I.C., P.O. Ogbobe, and A.D. Omah, *Initiatives and strategies for development of nanotechnology in nations: a lesson for Africa and other least developed countries*. Nanoscale research letters, 2014. **9**(1): p. 1-8.
82. Vogel, U., et al., *Handbook of nanosafety: Measurement, exposure and toxicology*. 2013: Elsevier.
83. Fransman, W., et al., *Comparative Human Health Impact Assessment of Engineered Nanomaterials in the Framework of Life Cycle Assessment*. Risk Analysis, 2016.
84. Nielsen, E., *Human Health and Nanomaterials in Consumer Products*. Literature Review for the Region of Peel's Public Health Unit, 2008.
85. Endo, C.-A., et al., *Portrait de la nanotechnologie au Québec dans les milieux industriels et de la recherche universitaire et publique*. R-854, 1-90. IRSST. 2015.
86. Ostiguy, C., et al., *Mapping the use of engineered NM in Quebec's industries and research laboratories*. Journal of Physics: Conference Series 429, 1-8. 2013.
87. NRC, *Risk assessment in the federal government: Managing the process*. 1983, Washington (DC), National Academy Press.
88. Emond, C. and L. Multigner. *Human Risk Assessment and Its Application to Nanotechnology: A Challenge for Assessors*. in *Journal of Physics: Conference Series*. 2015. IOP Publishing.
89. Emond, C., S. Kouassi, and F. Schuster, *Development of an integrative program of nanosafety: Promote the coordination between industries and risk assessor*. *Journal of Physics: Conference Series 429, 1-10*. 2013.
90. Emond, C., S. Kouassi, and F. Schuster, *Approche intégrée pour une conception et une manipulation sécuritaires des nanomatériaux - Un programme basé sur une concertation entre l'industrie et des évaluateurs des risques sanitaires*. R-877 , 1-35. 2015. (Report). 2015.
91. Zalk, D.M. and D.I. Nelson, *History and Evolution of Control Banding: A Review*. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 2008. **5**(5): p. 330-346.
92. Nelson, D.I. and D.M. Zalk, *Control Banding: Background, Critique, and Evolution*, in *Patty's Industrial Hygiene*. 2011, John Wiley & Sons, Inc.
93. Seaton, A., *Control of substances hazardous to health*. BMJ: British Medical Journal, 1989. **298**(6677): p. 846.
94. Topping, M., *Occupational exposure limits for chemicals*. Occupational and environmental medicine, 2001. **58**(2): p. 138-144.
95. Oldershaw, P., *Control banding workshop, 4-5 November 2002, London*. Annals of Occupational Hygiene, 2003. **47**(7): p. 531-532.

96. Zalk, D.M. and G.H. Heussen, *Banding the world together; the global growth of control banding and qualitative occupational risk management*. Safety and health at work, 2011. **2**(4): p. 375-379.
97. Anses, *Development of a specific control banding tool for nanomaterials*. Expert committee (CES) on physical agents. French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety, Maisons-Alfort Cedex, 2010.
98. Erbis, S., et al., *Review of Research Trends and Methods in Nano Environmental, Health, and Safety Risk Analysis*. Risk Analysis, 2016.
99. Chalupka, S., *Control Banding for Risk Management of Source Chemical Agents and Other Occupational Hazards*. Workplace Health & Safety, 2010. **58**(9): p. 404.
100. Garrod, A. and R. Rajan-Sithamparanadarajah, *Developing COSHH Essentials: dermal exposure, personal protective equipment and first aid*. Annals of Occupational Hygiene, 2003. **47**(7): p. 577-588.
101. Liguori, B., et al., *Control banding tools for occupational exposure assessment of nanomaterials—Ready for use in a regulatory context?* NanoImpact, 2016. **2**: p. 1-17.
102. Sánchez Jiménez, A., et al., *A comparison of control banding tools for nanomaterials*. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 2016. **13**(12): p. 936-949.
103. Eastlake, A., R. Zumwalde, and C. Geraci, *Can control banding be useful for the safe handling of nanomaterials? A systematic review*. Journal of Nanoparticle Research, 2016. **18**(6): p. 1-24.
104. EU-OSHA, “*E-fact 72: Tools for the management of nanomaterials in the workplace and prevention measures, 18*,” 2013.
105. Hansen, S.F., A. Baun, and K. Alstrup-Jensen, *NanoRiskCat—a conceptual decision support tool for nanomaterials*. 2011, Danish Ministry of the Environment.
106. Zalk, D. and S.Y. Paik. *Risk Assessment Using Control Banding*. in Elsevier Inc. 2011.
107. Höck, J., et al., *Guidelines on the precautionary matrix for synthetic nanomaterials*. Federal Office for Public Health and Federal Office for the Environment, Berne, 2008.
108. Höck, J., et al., *Guidelines on the precautionary matrix for synthetic nanomaterials*. Federal Office for Public Health and Federal Office for the Environment, Bern, 2010.
109. Brouwer, D.H., *Control banding approaches for nanomaterials*. Annals of occupational hygiene, 2012. **56**(5): p. 506-514.
110. Fleury, D., et al., *Nanomaterials Risk Assessment in the Process Industries: Evaluation and Application of Current Control Banding Methods*, in *Lp2013 - 14th Symposium on Loss Prevention and Safety Promotion in the Process Industries, Vols I and II*, E. DeRademaeker, et al., Editors. 2013, Aidic Servizi Srl: Milano. p. 949-954.
111. Jensen, K.A., et al. *NanoSafer vs. 1.1-nanomaterial risk assessment using first order modeling*. in *6th international symposium on nanotechnology, occupational and environmental health, Japan*. 2014.
112. Cornelissen, R., et al., *Guidance working safely with nanomaterials and products, the guide for employers and employees*. The Netherlands, Amsterdam, 2011.

113. Silva, F., et al. *Qualitative risk assessment during polymer mortar test specimens preparation-methods comparison*. in *Journal of Physics: Conference Series*. 2015. IOP Publishing.
114. Van Duuren-Stuurman, B., et al., *Stoffenmanager nano version 1.0: a web-based tool for risk prioritization of airborne manufactured nano objects*. *Annals of occupational hygiene*, 2012: p. mer113.
115. Xing, B., N. Senesi, and C.D. Vecitis, *Engineered Nanoparticles and the Environment: Biophysicochemical Processes and Toxicity*. Vol. 4. 2016: John Wiley & Sons.
116. Marquis, B.J., et al., *Analytical methods to assess nanoparticle toxicity*. *Analyst*, 2009. **134**(3): p. 425-439.
117. Elzey, S.R., *Applications and physicochemical characterization of nanomaterials in environmental, health, and safety studies*. 2010: The University of Iowa.
118. Li, X., et al., *Effects of physicochemical properties of nanomaterials on their toxicity*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2015. **103**(7): p. 2499-2507.
119. Rose, J., et al., *Physicochemical Properties of Nanoparticles in Relation with Toxicity*, in *Encyclopedia of Nanotechnology*, B. Bhushan, Editor. 2012, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 2085-2085.
120. Navya, P.N. and H.K. Daima, *Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives*. *Nano Convergence*, 2016. **3**(1): p. 1.
121. Arora, S., J.M. Rajwade, and K.M. Paknikar, *Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012. **258**(2): p. 151-165.
122. Pedata, P., et al., *Immunotoxicological impact of occupational and environmental nanoparticles exposure: The influence of physical, chemical, and combined characteristics of the particles*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2015. **29**(3): p. 343-353.
123. Gattoo, M.A., et al., *Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations*. *BioMed Research International*, 2014. **2014**: p. 8.
124. Martirosyan, A. and Y.-J. Schneider, *Engineered Nanomaterials in Food: Implications for Food Safety and Consumer Health*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2014. **11**(6): p. 5720-5750.
125. Oksel, C., et al., *(Q)SAR modelling of nanomaterial toxicity: A critical review*. *Particuology*, 2015. **21**(Supplement C): p. 1-19.
126. Oberdorster, G., et al., *Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy*. *Part Fibre Toxicol*, 2005. **2**: p. 8.
127. Jiang, J., G. Oberdörster, and P. Biswas, *Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2009. **11**(1): p. 77-89.
128. Porredon Guarch, C., et al., *Basis for the toxicological evaluation of engineered nanomaterials*. *Revista de Toxicología*, 2014. **31**(1).

129. Iavicoli, I., et al., *Assessment of occupational exposure to engineered nanomaterials in research laboratories using personal monitors*. Science of The Total Environment, 2018. **627**: p. 689-702.
130. Card, J.W. and B.A. Magnuson, *A method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials*. International journal of toxicology, 2010. **29**(4): p. 402-410.
131. Dimou, K. and C. Emond, *Nanomaterials, and Occupational Health and Safety—A Literature Review About Control Banding and a Semi-Quantitative Method Proposed for Hazard Assessment*. 2017.
132. OECD., *Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD's Sponsorship Programme*. Paris, France: ENV/JM/MONO(2009)20/REV, Organiza- tion for Economic Co-operation and Development. 2010.
133. Elsaesser, A. and C.V. Howard, *Toxicology of nanoparticles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**(2): p. 129-137.
134. Rivera Gil, P., et al., *Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future*. ACS nano, 2010. **4**(10): p. 5527-5531.
135. Warheit, D.B., et al., *Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks*. Pharmacology & Therapeutics, 2008. **120**(1): p. 35-42.
136. Bouwmeester, H., et al., *Minimal analytical characterization of engineered nanomaterials needed for hazard assessment in biological matrices*. Nanotoxicology, 2011. **5**(1): p. 1-11.
137. Powers, K.W., P.L. Carpinone, and K.N. Siebein, *Characterization of nanomaterials for toxicological studies*. Nanotoxicity: Methods and Protocols, 2012: p. 13-32.
138. Pettitt, M.E. and J.R. Lead, *Minimum physicochemical characterisation requirements for nanomaterial regulation*. Environment International, 2013. **52**(Supplement C): p. 41-50.
139. Oomen, A.G., et al., *Concern-driven integrated approaches to nanomaterial testing and assessment – report of the NanoSafety Cluster Working Group 10*. Nanotoxicology, 2014. **8**(3): p. 334-348.f
140. Ivask, A., et al., *Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro*. PloS one, 2014. **9**(7): p. e102108.
141. Park, M.V.D.Z., et al., *The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(36): p. 9810-9817.
142. Kim, T.-H., et al., *Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012. **100A**(4): p. 1033-1043.
143. Zapór, L., *Effects of silver nanoparticles of different sizes on cytotoxicity and oxygen metabolism disorders in both reproductive and respiratory system cells*. Archives of Environmental Protection, 2016. **42**(4): p. 32-47.
144. INAIL., *Italian Workers' Compensation Authority (INAIL) White Book, Exposure to Engineered Nanomaterials and Occupational Health and Safety Effects*. 2011: p. 211.

145. NIOSH., *Filling the Knowledge Gaps for Safe Nanotechnology in the Workplace. A Progress Report from the NIOSH Nanotechnology Research Center, 2004–2011.* 2012.
146. Warheit, D.B., et al., *Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties.* Toxicology, 2007. **230**(1): p. 90-104.
147. Karlsson, H.L., et al., *Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size.* Toxicology Letters, 2009. **188**(2): p. 112-118.
148. Bakand, S. and A. Hayes, *Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles.* International Journal of Molecular Sciences, 2016. **17**(6): p. 929.
149. Shin, S.W., I.H. Song, and S.H. Um, *Role of physicochemical properties in nanoparticle toxicity.* Nanomaterials, 2015. **5**(3): p. 1351-1365.
150. Holgate, S.T., *Exposure, uptake, distribution and toxicity of nanomaterials in humans.* Journal of biomedical nanotechnology, 2010. **6**(1): p. 1-19.
151. Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C.W. Chan, *Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells.* Nano Letters, 2006. **6**(4): p. 662-668.
152. Mahmoudi, M., et al., *Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle.* Chemical Reviews, 2011. **111**(5): p. 3407-3432.
153. Xie, X., et al., *The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles.* Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 3827.
154. Sharifi, S., et al., *Toxicity of nanomaterials.* Chemical Society reviews, 2012. **41**(6): p. 2323-2343.
155. Wang, S., et al., *Challenge in Understanding Size and Shape Dependent Toxicity of Gold Nanomaterials in Human Skin Keratinocytes.* Chemical physics letters, 2008. **463**(1-3): p. 145-149.
156. Shvedova, A., et al., *Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells.* Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2003. **66**(20): p. 1909-1926.
157. Monteiro-Riviere, N.A., et al., *Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes.* Toxicology letters, 2005. **155**(3): p. 377-384.
158. Poland, C.A., et al., *Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study.* Nature Nanotechnology, 2008. **3**: p. 423.
159. Girardello, R., et al., *Cellular responses induced by multi-walled carbon nanotubes: in vivo and in vitro studies on the medicinal leech macrophages.* Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 8871.
160. Xu, X. and M.A. Khan, *Regulatory Perspective on the Development of Polymer Nanomaterials,* in *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines: A Guide for their Design, Preparation and Development,* C. Vauthier and G. Ponchel, Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 615-633.
161. Fröhlich, E., *The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles.* International journal of nanomedicine, 2012. **7**: p. 5577.

162. He, C., et al., *Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles*. *Biomaterials*, 2010. **31**(13): p. 3657-3666.
163. El Badawy, A.M., et al., *Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles*. *Environmental science & technology*, 2010. **45**(1): p. 283-287.
164. Ha, M.K., et al., *Toxicity Classification of Oxide Nanomaterials: Effects of Data Gap Filling and PChem Score-based Screening Approaches*. *Scientific Reports*, 2018. **8**: p. 3141.
165. Pietroiusti, A., et al., *Low Doses of Pristine and Oxidized Single-Wall Carbon Nanotubes Affect Mammalian Embryonic Development*. *ACS Nano*, 2011. **5**(6): p. 4624-4633.
166. Hoshino, A., et al., *Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification*. *Nano Letters*, 2004. **4**(11): p. 2163-2169.
167. Nel, A.E., et al., *Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface*. *Nature materials*, 2009. **8**(7): p. 543-557.
168. Singh, N., et al., *NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials*. *Biomaterials*, 2009. **30**(23): p. 3891-3914.
169. Liu, Y., et al., *Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes*. *Biomaterials*, 2011. **32**(32): p. 8291-8303.
170. Kloet SK, et al., *Assessment of the potential developmental toxicity of positively and negatively charged polystyrene nanoparticles using the embryonic stem cell differentiation assay. In vitro assays for hazard identification of nanoparticles 2016*.
171. Li, R., et al., *Surface Charge and Cellular Processing of Covalently Functionalized Multiwall Carbon Nanotubes Determine Pulmonary Toxicity*. *ACS Nano*, 2013. **7**(3): p. 2352-2368.
172. Zhu, M., et al., *Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate*. *Accounts of Chemical Research*, 2013. **46**(3): p. 622-631.
173. Griffitt, R.J., et al., *Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008. **27**(9): p. 1972-1978.
174. Sohaebuddin, S.K., et al., *Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent*. *Particle and Fibre Toxicology*, 2010. **7**(1): p. 22.
175. Luyts, K., et al., *How physico-chemical characteristics of nanoparticles cause their toxicity: complex and unresolved interrelations*. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2013. **15**(1): p. 23-38.
176. Gurr, J.-R., et al., *Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells*. *Toxicology*, 2005. **213**(1): p. 66-73.
177. Sayes, C.M., et al., *Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells*. *Toxicological Sciences*, 2006. **92**(1): p. 174-185.

178. Jiang, J., et al., *Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase?* *Nanotoxicology*, 2008. **2**(1): p. 33-42.
179. Auffan, M., et al., *Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective.* *Nature nanotechnology*, 2009. **4**(10): p. 634.
180. K. Braydich-Stolle, L., et al., *Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity.* Vol. 11. 2009. 1361-1374.
181. Baalousha, M., et al., *EN15142 the concentration-dependent behaviour of nanoparticles.* *Environmental Chemistry*, 2016. **13**(10.1071).
182. Chen, Y., Y. Huang, and K. Li, *Temperature effect on the aggregation kinetics of CeO₂ nanoparticles in monovalent and divalent electrolytes.* *J. Environ. Anal. Toxicol*, 2012. **2**(7): p. 158-162.
183. Albanese, A. and W. C.W. Chan, *Effect of Gold Nanoparticle Aggregation on Cell Uptake and Toxicity.* Vol. 5. 2011. 5478-89.
184. Zhu, X., et al., *The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (Danio rerio).* *Nanotechnology*, 2009. **20**(19): p. 195103.
185. Lewinski, N., V. Colvin, and R. Drezek, *Cytotoxicity of Nanoparticles.* *Small*, 2008. **4**(1): p. 26-49.
186. Mahmoudi, M., et al., *A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles.* *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010. **75**(1): p. 300-309.
187. Stone, V., H. Johnston, and R.P.F. Schins, *Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations.* *Critical Reviews in Toxicology*, 2009. **39**(7): p. 613-626.
188. Sayes, C.M., et al., *Can in vitro assays substitute for in vivo studies in assessing the pulmonary hazards of fine and nanoscale materials?* *Journal of Nanoparticle Research*, 2009. **11**(2): p. 421-431.
189. Warheit, D., C. Sayes, and K. Reed, *Nanoscale and fine zinc oxide particles: can in vitro assays accurately forecast lung hazards following inhalation exposures?* *Environmental science & technology*, 2009. **43**(20): p. 7939-7945.
190. Sayes, C.M., K.L. Reed, and D.B. Warheit, *Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles.* *Toxicological sciences*, 2007. **97**(1): p. 163-180.
191. Wang, X., et al., *Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential.* *Small*, 2014. **10**(2): p. 385-398.