



RAPPORT D'ÉTUDE
N° DRC-16-157027-10246A

04/11/2016

**Proposition d'un repère toxicologique pour
l'oxyde de titane nanométrique pour des
expositions environnementales par voie
respiratoire ou orale**

INERIS

maîtriser le risque |
pour un développement durable |

Proposition d'un repère toxicologique pour l'oxyde de titane nanométrique pour des expositions environnementales par voie respiratoire ou orale

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

Client : Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer

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

PRÉAMBULE

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

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

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

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

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

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

TABLE DES MATIÈRES

RESUME	7
GLOSSAIRE	8
1. INTRODUCTION	9
2. PROPRIETES (INRS, 2013)	9
3. TOXICOCINETIQUE	10
3.1 Absorption	10
3.2 Distribution	10
3.3 Métabolisme.....	11
3.4 Élimination.....	11
4. EFFETS AIGUS	11
4.1 Voie respiratoire	11
4.1.1 Inhalation	11
4.1.2 Instillation intra-trachéale.....	12
4.2 Voie orale	12
4.3 Voie cutanée	12
4.4 Voie oculaire	12
5. EFFETS POUR DES EXPOSITIONS REPETEES (SUB-AIGUËS, SUB-CHRONIQUES ET CHRONIQUES)	13
5.1 Effets systémiques généraux	13
5.1.1 Voie respiratoire.....	13
5.1.1.1 Expositions par inhalation.....	13
5.1.1.1.1 Exposition sub-aiguë.....	13
5.1.1.1.2 Exposition sub-chronique.....	14
5.1.1.1.3 Exposition chronique.....	18
5.1.1.2 Exposition par instillation Intra-trachéale.....	18
5.1.1.3 Exposition intra-nasale	18
5.1.2 Voie orale	19
5.1.2.1 Exposition sub-aiguë.....	19
5.1.2.2 Expositions sub-chronique	20
5.2 Effets génotoxiques et cancérogènes	22
5.2.1 Effets génotoxiques	22
5.2.2 Effets cancérogènes.....	22
5.2.2.1 Exposition par voie respiratoire	22
5.2.2.1.1 Exposition par Inhalation	22
5.2.2.1.2 Exposition par voie Intra-trachéale.....	24
5.2.2.2 Exposition par voie orale	24

5.2.3 Classification	24
5.3 Effets sur le développement ou la reproduction	25
5.3.1 Effets sur la fertilité	25
5.3.2 Effets sur le développement	25
6. ETABLISSEMENT D'UNE RELATION DOSE EFFET	26
6.1 Voie respiratoire	26
6.1.1 Valeur pour des expositions professionnelles.....	26
6.1.2 Expositions environnementales : proposition de l'INERIS	27
6.1.2.1 Effets à seuil.....	28
6.1.2.2 Effets sans seuil	30
6.2 Voie orale	30
6.2.1 Réflexion pour les expositions via l'alimentation.....	30
6.2.2 Expositions environnementales : proposition de l'INERIS	31
6.2.2.1 Effets à seuil.....	31
6.2.2.2 Effets sans seuil	32
7. VALEURS DE REFERENCE.....	32
7.1 Exposition professionnelle (INRS, 2013, 2016 ; NIOSH, 2011).....	32
7.2 Exposition environnementale : propositions de l'INERIS.....	33
7.2.1 Effets à seuil	33
7.2.2 Effets cancérogènes.....	34
8. BIBLIOGRAPHIE	34

RESUME

Le dioxyde de titane sous forme nanométrique est de plus en plus utilisé. Cette utilisation croissante est à l'origine d'une exposition permanente des populations aussi bien professionnelle que via l'environnement. Les caractéristiques différentes de chaque forme de nanoparticule de TiO₂ sont à l'origine d'une variabilité des effets observés et ne permettent pas dans l'état actuel de déterminer une Valeur Toxicologique de Référence avec une incertitude raisonnable. Dans un but de prévention et à des fins exploratoires, il est proposé dans le présent rapport d'élaborer une valeur repère qui n'est pas une valeur toxicologique de référence mais une estimation pouvant aider le gestionnaire de risque.

Pour les expositions par voie respiratoire, l'analyse des données disponibles montre que le principal effet décrit est une atteinte pulmonaire de type inflammatoire avec des effets cytotoxiques et prolifératifs à l'origine de lésions histopathologiques généralement réversibles mais pouvant conduire à la formation de tumeurs en cas d'exposition prolongée. Ces effets induits par les nanoparticules sont plus marqués qu'avec les particules fines. Il est cependant à noter que plusieurs études, notamment celles réalisées par voie intranasale, ont mis en évidence d'autres types d'effets, en particulier des effets neurologiques.

Pour les **effets à seuil de dose**, la valeur proposée est **0,1 µg/m³**.

Elle est développée à partir de l'étude de Bermudez *et al.*, 2004 en retenant comme effet critique une augmentation du nombre de neutrophiles, une prolifération progressive de l'épithélium et une cytotoxicité pulmonaire. La dose critique est une NOAEC de 0,5 mg/m³. Un facteur d'incertitude de 900 est appliqué.

Compte tenu des effets cancérigènes pour des expositions par inhalation, une valeur pour des effets sans seuil de dose devrait être envisagée mais elle n'a pas pu être développée.

Pour les expositions par voie orale, des effets hépatiques, rénaux, cardiaques et neurologiques correspondant à des altérations de biomarqueurs précoces répondant de manière dose dépendante sont rapportés.

Pour les **effets à seuil de dose**, la valeur proposée est **3 µg/kg/j**.

Elle est élaborée à partir de deux études Gui *et al.*, 2011 et Ze *et al.*, 2014a en retenant comme effet critique les effets neurologiques et rénaux et comme dose critique le NOAEL de 2,5 mg/kg/j. Un facteur d'incertitude de 900 est appliqué.

En l'absence de données rapportant la survenue de cancer par cette voie d'exposition aucune valeur sans seuil n'a été envisagée

GLOSSAIRE

BET	: surface spécifique de Brunauer-Emmett-Teller
EFSA	: European Food Safety Authority
JEFCA	: Joint Expert Group on Food Additives
LOAEC	: Lowest observable adverse effect concentration
LOAEL	: Lowest observable adverse effect level
MMAD	: diamètre aérodynamique moyen
nanoTiO ₂	: particules de dioxyde de titane nanométriques
NOAEC	: No observable adverse effect concentration
NOAEL	: No observable adverse effect level
P25 Degussa	: nanoparticule de 21 nm de forme cristalline anatase/rutile en proposition qui peut varier mais majoritairement anatase (généralement entre 70 et 85 %) a été largement utilisée dans les différentes études expérimentales
TiO ₂	: dioxyde de titane

1. INTRODUCTION

Le dioxyde de titane sous forme nanométrique est de plus en plus utilisé dans diverses applications du fait de ses propriétés spécifiques. Cette utilisation croissante est à l'origine d'une exposition permanente des populations aussi bien professionnelle que via l'environnement. Dans un but de prévention et à des fins exploratoires, il est proposé dans le présent rapport l'élaboration de valeurs repères en toxicologie qui ne sont pas des valeurs toxicologiques de référence mais une première proposition de valeur pouvant aider le gestionnaire de risque dans la prévention des expositions aux nanoparticules. En effet, les propriétés spécifiques du TiO_2 sous forme nanométrique sont à l'origine d'une variabilité conséquente des effets, ne permettant pas dans l'état actuel des données disponibles de déterminer une Valeur Toxicologique de Référence avec une incertitude raisonnable. Il s'agit donc ici de valeurs préliminaires d'utilisation restreinte.

Une recherche bibliographique a été menée afin d'identifier les différentes données disponibles relatives aux effets sur la santé de l'exposition aux nanoparticules de TiO_2 . Ce travail a été réalisé en s'appuyant notamment sur plusieurs documents de synthèse (Afssaps, 2011 ; EFSA, 2016 ; IARC, 2010 ; INRS, 2013, NIOSH, 2011) et sur des articles originaux.

Une analyse de ces données a permis de sélectionner les informations utiles pour la proposition d'une relation dose-effet. Ainsi, la première étape de l'élaboration de ces valeurs a consisté en une analyse des données disponibles (INERIS, 2016) qui a mis en évidence les difficultés de caractériser les niveaux d'exposition dans les différents tests utilisés et les limites des résultats en termes de caractérisation des formes des nanoparticules utilisées. Malgré ces limites, le travail d'élaboration de valeurs a été poursuivi.

Le présent rapport propose une synthèse générale des données et une description des études clés qui ont été jugées les plus pertinentes pour l'élaboration d'une relation dose/effet. Ces études sont présentées de manière plus détaillée que les autres. Enfin, les informations rapportées concernent les particules de TiO_2 sous forme nanométrique, cependant il s'est avéré utile de présenter quelques données relatives à des formes micrométriques afin de compléter ou de consolider les observations réalisées sur les formes nanométriques ; quand c'est le cas, ces données, pour les formes micrométriques, sont clairement identifiées dans le texte.

En aucun cas, il ne s'agit d'une description exhaustive de l'ensemble des données bibliographiques relatives aux nanoparticules de TiO_2 .

2. PROPRIETES (INRS, 2013)

Le dioxyde de titane (formule chimique TiO_2 , N°CAS : 13463-67-7) se trouve dans la nature sous la forme cristalline : rutil (CAS : 1317-80-2), brookite (CAS : 12188-41-9) et anatase (cas : 1317-70-0).

Il est le plus souvent retrouvé sous la forme rutil (forme plus stable) et plus rarement sous forme anatase.

Le dioxyde de titane ultrafin ou nanométrique est composé principalement de particules primaires de taille < 100 nm dont le diamètre est généralement compris

entre 10 et 50 nm avec une surface spécifique BET¹ variant de 10 à 300 m²/g (soit une surface spécifique volumique équivalente d'environ 40 – 1 200 m²/cm³).

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

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

3. TOXICOCINETIQUE

Les données disponibles sont essentiellement issues des études expérimentales. Toutefois, il est à noter que plusieurs études épidémiologiques récentes menées avec différentes nanoparticules, notamment celles de magnétite, rapportent la présence de ces particules dans différentes régions du cerveau.

3.1 ABSORPTION

L'absorption des nano particules de TiO₂ pour les différentes voies d'exposition (respiratoire, digestive et cutanée) est dépendante de leurs compositions et de leurs potentiels à former des agglomérats (Wang *et al.*, 2013). Dans tous les cas, il semble qu'elle reste limitée au niveau de l'intestin pour différentes tailles de nanoTiO₂ (Jones *et al.*, 2015 ; Cho *et al.*, 2013) et de la peau (Afssaps, 2011 ; Sadrieh *et al.*, 2010).

Par ailleurs, plusieurs études ont identifié une voie de pénétration spécifique aux nanoparticules par instillation intranasale.

3.2 DISTRIBUTION

Pour des expositions par inhalation ou injection intratrachéales, les nanoparticules de TiO₂ se distribuent dans les ganglions lymphatiques, le foie et les reins et passent la barrière hématoencéphalique (Creutzenberg *et al.*, 1990 ; INRS, 2013 ; Li *et al.*, 2010). La demi-vie pulmonaire a été estimée à 550 jours pour une exposition de 18 mois à la concentration de 10 mg.m⁻³ à des particules de TiO₂ de type P25 Degussa².

Après exposition par voie instillation nasale, les résultats montrent qu'une accumulation de nanoparticules de TiO₂ est observée dans certaines parties du cerveau. Ainsi, une translocation³ neuronale est suspectée d'être à l'origine de cette accumulation dans le cortex cérébral, le thalamus, l'hippocampe et le bulbe

¹ La surface spécifique de Brunauer-Emmett-Teller

² Cette nanoparticule de 21 nm de forme cristalline anatase/rutile en proportion qui peut varier mais majoritairement anatase (généralement entre 70 et 85 %) a été largement utilisée dans différentes études expérimentales.

³ Translocation : migration des particules à partir du site de déposition.

olfactif qui témoigne également d'un passage de ces particules au travers de la barrière hémato-encéphalique (INRS, 2013 ; Wang *et al.*, 2008a).

Pour des expositions par voie orale, la distribution varie. Ainsi, les particules nanométriques (25 à 80 nm) s'accumulent dans le foie, la rate, les poumons et les reins 2 semaines après l'exposition à la suite d'une translocation circulatoire (INRS, 2013 ; Wang *et al.*, 2007). Une autre étude montre une faible distribution dans le foie, la rate, les reins et le cerveau du TiO₂ pour une exposition de 13 semaines (Cho *et al.*, 2013).

Pour une exposition cutanée chez des mini-porcs exposés 4 fois par jour, 5 jours par semaine pendant 22 jours à des nanoTiO₂, une augmentation statistiquement significative de la quantité de nanoTiO₂ dans les ganglions lymphatiques inguinaux est observée uniquement chez ceux exposés aux nano TiO₂ non enrobés par rapport aux témoins. Cette observation n'est pas retrouvée pour des nanoTiO₂ enrobés (Sadrieh *et al.*, 2010).

3.3 METABOLISME

Il n'existe pas d'informations disponibles concernant le métabolisme de ces particules (INRS, 2013).

3.4 ÉLIMINATION

Après administration intraveineuse, les nanoparticules sont majoritairement excrétées via les urines (INRS, 2013).

4. EFFETS AIGUS

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

4.1 VOIE RESPIRATOIRE

De nombreux auteurs ont montré que les particules ultrafines de TiO₂ (taille < 100 nm) étaient plus toxiques que les particules fines (taille > 100 nm) à doses équivalentes en masse (INRS, 2013). Dans ces études, la dose exprimée en surface était mieux corrélée aux effets observés que la dose exprimée en masse. Il semblerait que la surface spécifique plus élevée des nanoparticules (versus les particules fines) joue un rôle important, vraisemblablement par libération de radicaux libres. En revanche, pour une même forme cristalline (anatase), il a été montré que des particules de 5 nm étaient moins toxiques que celles de 21 nm en ce qui concerne l'induction d'une réaction inflammatoire (différence modérée mais statistiquement significative), à la suite d'une exposition corps entier ou par instillation intranasale (INRS, 2013 ; Grassian *et al.*, 2007). Ces différences seraient liées aux formes d'agrégation qui joueraient un rôle aussi important que la surface spécifique et les caractéristiques physiques de la nanoparticule initiale.

4.1.1 INHALATION

Plusieurs études ont évalué les effets d'une exposition aiguë par inhalation (Geiser *et al.*, 2005 ; Jonasson *et al.*, 2013 ; Kwon *et al.*, 2012 ; Ma-Hock *et al.*,

2009 ; Noël *et al.*, 2013 ; Nurkiewicz *et al.*, 2008 ; Nurkiewicz *et al.*, 2009). Ces études correspondent à des expositions à des nanoparticules de TiO₂ différentes mais rapportent toutes des réactions inflammatoires pulmonaires plus ou moins marquées voire de la cavité nasale. Certaines d'entre elles ont montré le caractère réversible de ces effets. De plus, une altération de la microvascularisation au niveau du muscle spinotrapézien a également été identifiée.

4.1.2 INSTILLATION INTRA-TRACHEALE

De nombreuses études ont évalué les effets d'une exposition aiguë par instillation intratrachéale (Cho *et al.*, 2010 ; Husain *et al.*, 2013 ; Kobayashi *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2009 ; Nemmar *et al.*, 2008 ; Nemmar *et al.*, 2011 ; Park *et al.*, 2009). Au niveau pulmonaire, les principaux effets observés sont une réponse inflammatoire, une atteinte des tissus, une cytotoxicité et des altérations morphologiques, plus ou moins marquées selon la taille des particules. Il a été montré dans certaines conditions expérimentales que l'aire des nanoparticules plus que l'enrobage de surface serait déterminante dans l'induction de la réaction inflammatoire pulmonaire (Höhr *et al.*, 2002). Enfin, il a été montré qu'une instillation intratrachéale de nanoTiO₂ à de très faibles doses n'induit pas de réaction inflammatoire mais une rétention des particules et une modification de l'expression des gènes (Husain *et al.*, 2013).

4.2 VOIE ORALE

Par voie orale, la toxicité aiguë est faible (INRS, 2013). Les rares effets rapportés sont une augmentation statistiquement significative du poids relatif du foie chez les femelles exposées à des nanoparticules (25 - 80 nm) par rapport au témoin (Wang *et al.*, 2007). Les nanoparticules sont à l'origine d'une réponse inflammatoire hépatique (augmentation du taux de transaminases sériques) et de légères altérations histopathologiques du foie (présence d'hépatocytes nécrosés) et des reins (présence de protéines dans les tubules rénaux et augmentation du volume glomérulaire) ainsi qu'une augmentation par rapport aux témoins des biomarqueurs enzymatiques d'atteinte cardiaque.

4.3 VOIE CUTANEE

Aucune irritation cutanée ou sensibilisation n'a été rapportée.

4.4 VOIE OCULAIRE

Au niveau oculaire, une légère rougeur de la conjonctive est observée, chez le rat, après l'instillation des particules ultrafines de TiO₂ ; elle est réversible au bout de 48 h.

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

5.1 EFFETS SYSTEMIQUES GENERAUX

5.1.1 VOIE RESPIRATOIRE

L'organe cible est le poumon, sur lequel des effets inflammatoires, cytotoxiques et prolifératifs ainsi que des altérations histologiques ont été observés.

L'intensité des effets dépend notamment, de la taille des particules, de la forme cristalline et de l'enrobage éventuel (INRS, 2013). En effet, les nanoparticules de TiO₂ de la forme anatase génèrent spontanément des espèces réactives de l'oxygène, contrairement à la forme rutile, contribuant à accroître la toxicité du TiO₂ sous la forme anatase. Cependant d'autres éléments peuvent modifier la réactivité des nanoparticules de TiO₂, tels que l'enrobage de surface, la taille et les caractéristiques physiques des particules réellement administrées : ainsi certaines peuvent s'agglomérer ou s'agréger ce qui modifie leur capacité de pénétration dans l'organisme et les effets induits.

En pratique, les formes de chaque sorte de particule ainsi que leur préparation pour l'administration peuvent faire varier de manière notable les effets observés. La description de ses différents éléments est souvent documentée de manière partielle dans la littérature, il est donc difficile de comparer les effets observés entre les différentes études (INERIS, 2016).

Les principaux effets induits sont présentés sous forme synthétique ; seules les principales études permettant de proposer une valeur repère sont présentées ci-après plus en détail.

5.1.1.1 EXPOSITIONS PAR INHALATION

5.1.1.1.1 EXPOSITION SUB-AIGUË

Deux études rapportent les effets d'une exposition sub-aiguë par inhalation (Rossi *et al.*, 2009 ; Yu *et al.*, 2015).

- **Yu *et al.*, 2015**

Des souris A/J ont été exposées en corps entier à 0 – 2,5 – 5 – 10 mg.m⁻³, 6 h/j, 5j/sem pendant 28 jours. A 2,5 mg.m⁻³, une hyperplasie et une hémorragie pulmonaire sont observées. A 5 mg.m⁻³, une hyperémie⁴, une atélectasie⁵ bronchique et un dépôt brun de macrophages alvéolaires chargés de particules sont observés. A la concentration la plus élevée, 10 mg.m⁻³, une atélectasie bronchique et une hyperplasie multifocale du tissu lymphoïde sont rapportées. Ces résultats montrent une hyperplasie pulmonaire et une inflammation dose-dépendante associées à des dysfonctionnements du réticulum endoplasmique et mitochondrial. Cette étude présente une caractérisation de la particule initiale et de la fraction inhalée : 19,3 ± 5,4 nm et un diamètre aérodynamique moyen

⁴ Excès de sang causant une congestion localisée.

⁵ Affaissement des alvéoles pulmonaires causé par une absence de ventilation consécutive à l'obstruction d'une bronche.

(MMAD) $470 \pm 3,09$ nm. La **LOAEC** : $2,5 \text{ mg.m}^{-3}$ est identifiée pour une hyperplasie et une hémorragie pulmonaires.

- **Rossi et al., 2010b ; Rossi et al., 2010a**

Des souris Balb/c femelles ont été exposées à 10 mg.m^{-3} de nano TiO_2 2 h – 2 h/j pendant 4j ou 2 h/j 4 j/sem pendant 4 sem à 5 types de particules différentes TiO_2 (rutile) avec un enrobage de SiO_2 (10 x 40 nm), TiO_2 (anatase) (<25 nm), TiO_2 (rutile) (< 5 nm), TiO_2 (rutile/anatase 9/1) (30 - 40 nm) et TiO_2 (anatase/brookite 3/1) (21 nm). Ce sont les nano TiO_2 enrobées avec de la silice qui ont induit une augmentation statistiquement significative du pourcentage de neutrophiles viables dans le lavage bronchoalvéolaire par rapport aux témoins et dans une moindre mesure les particules de rutile non enrobées (augmentation non statistiquement significative). Pour les autres types de particules, il n'y a pas d'effet observé.

Cette étude souligne la différence d'effet en fonction de la nature de la particule tant au niveau de la structure cristalline que de la taille ou de l'enrobage. Une **LOAEC = 10 mg/m^{-3}** est retenue pour une augmentation statistiquement significative du pourcentage de neutrophiles viables dans le lavage bronchoalvéolaire pour les nanoparticules de TiO_2 enrobées avec du SiO_2 . Cette réaction témoigne d'une réaction inflammatoire mais peut être interprétée comme un effet néfaste ou adaptatif.

Les mêmes auteurs ont comparé pour des conditions expérimentales similaires les effets du TiO_2 chez des souris en bonne santé et des souris asthmatiques (sensibilisées à l'ovalbumine). Les résultats de cette étude mettent en évidence une réponse différente des animaux sains et sensibilisés (niveaux de leucocytes, cytokines, chemokines et anticorps spécifiques de l'asthme allergique diminué).

- **Jonasson et al., 2013**

Une étude menée chez la souris BALB/c femelle exposée par inhalation pendant environ 4 semaines à un aérosol de particules de TiO_2 (P25 Degussa) avant ou pendant des périodes de sensibilisation a montré que les nanoparticules peuvent induire une aggravation des symptômes respiratoires chez les animaux présentant des pathologies allergiques par rapport aux animaux sans pathologie.

5.1.1.1.2 EXPOSITION SUB-CHRONIQUE

Quatre études rapportent les effets d'une exposition sub-chronique par inhalation (Baggs et al., 1997 ; Bermudez et al., 2002 ; Bermudez et al., 2004 ; Oberdorster et al., 1994). Parmi ces études, celle menée par Bermudez et al., 2002 a été réalisée avec des particules fines de TiO_2 , elle est malgré tout rapportée ici pour confirmer les effets décrits dans les autres études.

- **Oberdörster et al., (1994)**

Des rats mâles Fisher ont été exposés 6 h/j, 5 j/sem pendant 12 semaines à la concentration de $23,5 \pm 2,9 \text{ mg.m}^{-3}$ de particules ultrafines de TiO_2 et de $22,3 \pm 4,2 \text{ mg.m}^{-3}$ de particules fines de TiO_2 . Un lot d'animaux exposés à de l'air filtré a servi de témoin. Chacun des lots était constitué de 64 animaux. Les deux types de particules étaient de forme cristalline anatase. Les particules ultrafines

utilisées avaient un diamètre de 20 nm et il a été mesuré qu'elles formaient des agglomérats lors de l'aérosolisation de diamètre moyen aérodynamique de $0,71 \pm 1,9 \mu\text{m}$; les particules fines avaient un diamètre de 250 nm et formaient des agglomérats d'un diamètre moyen aérodynamique de $0,78 \pm 1,7 \mu\text{m}$. La période de récupération était de 4, 8, 12, 29 ou 64 semaines. Après 12 semaines d'exposition la charge pulmonaire est similaire avec les deux types de particules. Les particules ultrafines ont induit une réaction inflammatoire plus importante. La rétention des particules au cours de la période de récupération, jusqu'à un an n'est pas différente. Cependant, il existe des différences : une différence de rétention pulmonaire totale, à la fois quantitativement (une augmentation statistiquement prolongée du temps de rétention des particules ultrafines) et qualitativement (augmentation de la translocation de l'interstitium pulmonaire et persistance à ce niveau des particules ultrafines) ; un effet épithélial plus important (prolifération des cellules de type II, occlusion des pores de Kohn) et le début d'une fibrose interstitielle localisée avec les particules ultrafines, et enfin une altération statistiquement significative des fonctions des macrophages alvéolaires avec les particules ultrafines. Un lien entre la surface spécifique des particules et les effets est établie.

De cette étude **une LOAEC : $23,5 \text{ mg.m}^{-3}$** pour une réaction inflammatoire est déterminée mais **pas de NOAEC**.

Evaluation de l'étude : la caractérisation des particules n'est pas complète, et une seule concentration a été étudiée ce qui ne permet pas d'établissement d'une relation dose effet mais seule la détermination d'une LOAEC.

- **Baggs et al., 1997**

Des rats mâles Fisher 344 ont été exposés en corps entier à des particules de TiO_2 6 h/j, 5 j/sem pendant 13 semaines. Quatre lots ont été constitués :

- un lot témoin avec de l'air filtré,
- un lot TiO_2 -F (particules fines, pigment de TiO_2 de Fisher Scientific taille des particules de 250 nm et une concentration $22,3 \text{ mg.m}^{-3}$),
- un lot TiO_2 -D (particules ultrafines de TiO_2 commercialisées par Degussa avec des particules de taille 20 nm et une concentration $23,5 \text{ mg.m}^{-3}$) et
- un lot SiO_2 cristalline (de cristobalite avec des particules de taille 800 nm).

Des lots de 3 à 4 animaux ont été sacrifiés à 6 et 12 mois après la fin de l'exposition. Les effets pulmonaires ont été recherchés. Une fibrose interstitielle locale modérée et une alvéolite locale sévère à modérée ont été observées à 6 mois chez les animaux exposés à la silice. Une fibrose un peu moins importante a été observée chez les animaux exposés à TiO_2 -D et encore moins importante chez ceux du lot TiO_2 -F. Un an après l'exposition, la fibrose reste persistante chez les animaux traités à la silice même si elle est bien moins sévère, un retour à la normale est observé chez les animaux exposés au titane.

De cette étude, une **LOAEC de $23,5 \text{ mg.m}^{-3}$** est déterminée pour une fibrose réversible observée lors de l'exposition aux particules ultrafines de TiO_2 commercialisées par Degussa avec des particules de taille 20 nm.

Evaluation de l'étude : Les éléments de cette étude sont peu décrits tant en ce qui concerne les caractéristiques des particules utilisées que les conditions expérimentales. Pour chacune des particules testées, une seule concentration a été utilisée.

- **Bermudez et al., 2002**

Des femelles rats, souris et hamster ont été exposées à 10 – 50 – 250 mg.m⁻³ de particules pigmentaires de TiO₂ (p-TiO₂) 6 h/j, 5 j/sem pendant 13 semaines avec une période de récupération de 4, 13, 26 ou 52 semaines (46 semaines pour les hamsters). A chaque temps, la charge particulaire dans les poumons et les ganglions lymphatiques a été évaluée ainsi que la réponse pulmonaire à cette exposition. Les particules de type rutile ont été produites par la compagnie DuPont. Les médianes et moyennes géométriques des diamètres aérodynamiques des particules ont été mesurées pour les expositions chez les trois différentes espèces (tableau 1). Aucune autre information n'est disponible concernant les caractéristiques de ces particules. Cependant, les informations rapportées par le même auteur en 2004 précisent qu'il s'agit de particules fines et pas de nanoparticules.

Tableau 1 : Diamètre aérodynamique moyen en fonction des espèces (Bermudez et al., 2002)

Espèce	Diamètre aérodynamique moyen	Ecart-type
Hamster	1,36	0,07
Souris	1,39	0,04
Rat	1,44	0,09

Au cours des expositions un suivi en continu a été mis en place et les concentrations moyennes ont été calculées 6 fois en 6 h.

Le dépôt de particules dans les poumons et dans les ganglions lymphatiques associés aux poumons augmente de manière dépendante de la concentration. La quantité retenue dans les poumons de souris est plus importante que chez les deux autres espèces. Les résultats suggèrent une surcharge pulmonaire chez le rat et la souris pour des expositions à 50 – 250 mg.m⁻³ alors que le hamster présente une bonne capacité d'élimination à ces niveaux d'exposition. Une inflammation a été retrouvée chez les trois espèces pour des expositions à 50 – 250 mg.m⁻³. Les effets pulmonaires sont plus sévères chez les rats qui présentent des altérations épithéliales et fibroprolifératives à 250 mg.m⁻³. A cette concentration les rats développent une réponse inflammatoire pulmonaire plus sévère et persistante que les deux autres espèces et seul le rat présente le développement de lésions fibroprolifératives et une métaplasie de l'épithélium alvéolaire.

De cette étude **une NOAEC : 10 mg.m⁻³ et LOAEC : 50 mg.m⁻³** sont déterminées pour les effets pulmonaires chez les rats. Cette étude montre que le rat est l'espèce la plus sensible et doit être celle retenue.

Evaluation de l'étude : le protocole suit les recommandations des lignes directrices, mais la qualification des particules n'est pas suffisamment détaillée. Il s'agit de particules fines et non nanométriques. Cette étude ne peut pas être utilisée pour la construction d'une valeur repère.

- **Bermudez et al., 2004**, (sub-chronique par inhalation)

Une deuxième étude a été menée avec un protocole identique mais avec des particules différentes et des concentrations d'exposition plus basses. Il s'agit ici de particules ultrafines de TiO₂ de diamètre moyen de 21 nm et de diamètre aérodynamique moyen de 1,37 µm (Nanoparticule de Degussa). Les concentrations utilisées étaient de 0,5 – 2,0 – 10 mg.m⁻³. Les effets mesurés sont similaires à ceux décrits au cours de la première étude. La charge pulmonaire est similaire chez les rats et les souris, elle est plus importante que chez les hamsters. Cette charge pulmonaire diminue après l'arrêt de l'exposition ; à la fin de la période de récupération elle est de 57, 45 et 3 % respectivement chez les rats, les souris et les hamsters. Une inflammation pulmonaire est mise en évidence à 10 mg.m⁻³ chez les rats et les souris ; elle est plus marquée chez les rats. Ces effets ne sont pas retrouvés chez les hamsters ce qui traduit la capacité de clairance de cette espèce. Des altérations fibroprolifératives et progressives au niveau épithélial, consistant en une bronchiolisation alvéolaire sont observées chez les rats, ces effets augmentent après la fin de l'exposition. Ces effets ne sont pas retrouvés chez les souris ou les hamsters. A la plus faible concentration chez les rats, il est observé une augmentation du nombre de neutrophiles, une prolifération progressive de l'épithélium et une cytotoxicité chez le rat. L'espèce la plus sensible est le rat.

Une **NOAEC de 0,5 mg.m⁻³** et **LOAEC : 2 mg.m⁻³** pour les altérations histologiques correspondant une augmentation du nombre de neutrophiles, une prolifération progressive de l'épithélium et une cytotoxicité chez le rat.

Evaluation de l'étude : le protocole suit les recommandations des lignes directrices. La qualification des particules est peu détaillée dans le rapport cependant, il s'agit d'une forme commerciale par ailleurs bien décrite. Les résultats de cette étude sont cohérents avec ceux d'une autre étude du même auteur réalisée avec un protocole similaire mais avec du TiO₂ non particulaire (étude décrite au-dessus).

L'analyse comparée des 3 études réalisées avec des nanoparticules (tableau 2) montre que le rat semble être l'espèce la plus sensible pour les effets pulmonaires, que les niveaux auxquels sont décrits les effets sont du même ordre de grandeur et que ces effets correspondent tous à une réaction inflammatoire au niveau pulmonaire.

Tableau 2 : Synthèse des études pouvant être utilisées pour l'élaboration d'une valeur

Espèce, sexe et conditions d'exposition	Concentrations testées au cours de l'étude	Description des particules	Concentrations critiques et effets associés	Référence
Rats mâles Fisher 6 h/j, 5 j/sem pendant 12 semaines	23,5 ± 2,9 mg.m ⁻³	particules ultrafines de TiO ₂ agglomérats lors de l'aérosolisation de diamètre moyen aérodynamique de 0,71 ± 1,9 µm	LOAEC : 23,5 mg.m⁻³ pour une réaction inflammatoire, pas de NOAEC	<u>Oberdörster et al. (1994)</u>
Rats mâles Fisher 344 6 h/j, 5 j/sem pendant 13 semaines	23,5 mg.m ⁻³	particules ultrafines de TiO ₂ commercialisées par Degussa avec des particules de taille 20 nm	LOAEC de 23,5 mg.m⁻³ pour une fibrose réversible, pas de NOAEC	<u>Baggs et al., 1997</u>
Femelles rats 6 h/j, 5 j/sem pendant 13 semaines avec une période de récupération de 4, 13, 26 ou 52 semaines	0,5 – 2,0 – 10 mg.m ⁻³	particules ultrafines de TiO ₂ commercialisées par Degussa de diamètre moyen de 21 nm et de diamètre aérodynamique moyen de 1,37 µm	LOAEC : 2 mg.m⁻³ pour les effets pulmonaires NOAEC : 0,5 mg.m⁻³ et	<u>Bermudez et al., 2004</u>

5.1.1.1.3 EXPOSITION CHRONIQUE

La seule étude rapportant des effets chroniques pour une exposition par inhalation est celle de cancérogenèse de Heinrich *et al.*, 1995. Cette étude est décrite au § 5.2.

5.1.1.2 EXPOSITION PAR INSTILLATION INTRA-TRACHEALE

Les seules études directement utilisables pour la construction d'une relation dose-effet sont celles pour une exposition par inhalation car c'est la seule qui soit réellement représentative de l'exposition humaine. Cependant, les données issues d'études pour des expositions intratrachéales ou intra-nasale apportent des informations complémentaires utiles pour évaluer les effets d'une exposition chronique aux nanoparticules de TiO₂.

Une étude menée pour des expositions intra-trachéales quotidiennes pendant 13 semaines avec des doses de 2,5 – 5 et 10 mg.kg⁻¹ pc de TiO₂ (anatase) de taille 6,5 nm chez la souris CD-1 a évalué les mécanismes inflammatoires impliqués et a montré qu'il s'agirait de stress oxydant et de l'expression de cytokines inflammatoires (Sun *et al.*, 2012).

5.1.1.3 EXPOSITION INTRA-NASALE

Plusieurs études ont évalué les effets neurologiques d'une exposition sub-aiguë à sub-chronique par voie intra-nasale (Wang *et al.*, 2008a ; Wang *et al.*, 2008b ; Ze *et al.*, 2013 ; Ze *et al.*, 2014b ; Ze *et al.*, 2014c ; Ze *et al.*, 2014d ; Zhang *et al.*, 2011). Ces études ont été menée avec une seule dose chez la souris. Elles montrent des altérations au niveau du cerveau (hippocampe et bulbe olfactif) ainsi que des réactions jusqu'à 30 jours après la fin de l'exposition. Les résultats sont différents en fonction de la nanoparticule testée, la forme anatase serait plus réactive que la forme rutile) (Wang *et al.*, 2008a ; Wang *et al.*, 2008b). Une accumulation des nanoparticules de TiO₂ est également mise en évidence pour

des expositions de 13 semaines et est associée à une altération des biomarqueurs de la réponse inflammatoire et des altérations de la mémoire spatiale chez la souris (Ze *et al.*, 2013 ; Ze *et al.*, 2014c), de dysfonctionnement du métabolisme du glutamate (Ze *et al.*, 2014d). Une autre étude met en évidence des altérations des niveaux de monoamine neurotransmetteurs dans certaines sous-régions du cerveau de souris ainsi que des altérations histologiques des neurones pour des expositions à des nanoTiO₂ (rutile) de taille et composition différentes ; les résultats diffèrent en fonction des caractéristiques de la nanoTiO₂ et du neurotransmetteur mesuré (Zhang *et al.*, 2011).

Ces données sont insuffisantes pour proposer une relation dose-effet cependant elles montrent que la nanoTiO₂ passent la barrière hématoencéphalique et sont susceptibles d'agir dans différentes régions du cerveau. Dans l'attente d'études complémentaires, la possibilité d'altérations neurologiques lors d'expositions aux nanoTiO₂ qui devra être prise en compte par l'utilisation de facteur d'incertitude au niveau la proposition d'une valeur.

5.1.2 VOIE ORALE

Les données disponibles sont limitées à des études non conventionnelles, généralement limitées à l'évaluation d'un ou plusieurs paramètres. Malgré tout, ces études ont mis en évidence la survenue d'effets hépatiques, rénaux, cardiaques et neurologiques.

5.1.2.1 EXPOSITION SUB-AIGUË

Les seules études disponibles sont celles pour des expositions par sonde intragastrique.

Des rats jeunes et adultes ont été exposés à 0 – 10 – 50 – 200 mg.kg⁻¹ de TiO₂ nanométrique (diamètre moyen 75 ± 15 nm) pendant 4 semaines, administrés par sonde intra-gastrique (INRS, 2013 ; Wang *et al.*, 2013). Ces nanoparticules sont des cristaux sphériques de forme anatase (pureté 99,9 %) avec un groupement hydroxyl en surface, diamètre moyen 75 ± 15 nm, surface spécifique BET 63,95 m².g⁻¹. Les jeunes rats apparaissent plus sensibles que les adultes : le foie (œdème associé à une hypertrophie des cellules périlobulaires, vacuolisation et dégénérescence hydropique, des modifications de certains paramètres biochimiques) et le cœur (diminution de l'activité d'enzymes cardiaques) sont les organes cibles à 50 et 200 mg.kg⁻¹.j⁻¹. Chez les rats adultes, seules de légères atteintes du foie (infiltration de cellules inflammatoires et diminution de la bilirubine totale sérique) et des reins (augmentation de l'azote uréique) sont rapportées à 50 et 200 mg.kg⁻¹.j⁻¹.

De cette étude, un **NOAEL de 10 mg.kg⁻¹.j⁻¹** et **LOAEL de 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹** pour les effets hépatiques et rénaux sont déterminés pour une durée d'exposition de 4 semaines.

Chez la souris, deux études ont évalué les effets d'une exposition intragastrique subaiguë (Hu *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2011). Elles rapportent des effets sur l'hippocampe et des altérations de la reconnaissance spatiale et de la mémoire dès la dose la plus faible chez la souris pour des expositions à 0 – 5 – 10 - 50 mg/kg/j pendant 8 semaines (Hu *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2011). La nanoparticule utilisée est de structure cristalline anatase et de taille 5 nm.

5.1.2.2 EXPOSITIONS SUB-CHRONIQUE

Trois études pour des expositions sub-chroniques ont été identifiées chez la souris pour des expositions intragastriques (Gui *et al.*, 2011 ; Sang *et al.*, 2013 ; Ze *et al.*, 2014a). Dans ces trois études les particules sont préparées par hydrolyse de tétrabutoxide de titane pour des compositions sensiblement identiques.

- **Gui *et al.*, 2011**

Des expositions à 0 – 2,5 – 5 - 10 mg/kg/j de nanoTiO₂ pendant 13 semaines chez la souris induisent une accumulation des nanoTiO₂ au niveau rénal et des effets rénaux (néphrite, nécrose cellulaire et des dysfonctionnements de type altération de l'expression des cytokines de l'inflammation et réduction des mécanismes de détoxification des nanoTiO₂). Les particules utilisées ont été caractérisées : 6,5 nm, structure anatase (100 %), aire de surface : 174,8 m²/g et potentiel zêta 7,57 mV. Le diamètre moyen hydrodynamique des particules dans le solvant est 294 nm et le potentiel zêta 7,57 ou 8,2_ mV après 12 ou 24 d'incubation. Les altérations rénales augmentent graduellement avec le temps. Les altérations histologiques sont dose-dépendantes. A 2,5 mg/kg/j, il est observé une infiltration des cellules inflammatoire et une congestion des vaisseaux sanguins du mésenchyme. A 5 mg/kg/j, les mêmes effets sont rapportés associés à une nécrose des cellules de l'épithélium du tubule rénal. La zone de nécrose est plus étendue à 10 mg/kg/j. Les effets sont peu importants à la plus faible dose qui peut être considérée comme un NOAEL. Selon les auteurs, l'altération cellulaire associée à celle des différents marqueurs évalués témoigne d'une réaction de défense de l'organisme mais également de dysfonctionnements rénaux qui pourraient s'aggraver pour des durées d'exposition plus longues.

De cette étude un **NOAEL de 2,5 mg/kg/j** et un **LOAEL de 5 mg/kg/j** peuvent être retenus pour des effets rénaux chez la souris.

Evaluation de l'étude : la caractérisation des nanoparticules est bien renseignée. Le test suit les bonnes pratiques de laboratoire. Un suivi général de l'état de santé des animaux est réalisé avec des examens plus spécifiques concernant la fonction rénale.

- **Sang *et al.*, 2013**

Une autre étude montre des effets spléniques (déposition des particules, production d'espèces réactives de l'oxygène, inflammation et nécrose) chez la souris pour des expositions à 10 mg/kg/j. Les particules utilisées ont été caractérisées : 5,5 nm, structure anatase (100 %), aire de surface : 174,8 m²/g et potentiel zêta 7,57 mV. Dans cette étude une seule dose a été testée pour différentes durées d'exposition de 2 à 13 semaines.

De cette étude un **LOAEL de 10 mg/kg/j** peut être retenu pour des effets spléniques chez la souris.

Evaluation de l'étude : la caractérisation des nanoparticules est bien renseignée. Le test suit les bonnes pratiques de laboratoire. Un suivi général de l'état de santé des animaux est réalisé avec des examens plus spécifiques les effets spléniques. Une seule dose a été testée, ce qui ne permet pas l'établissement d'une relation dose-effet.

- **Ze et al., 2014a**

La présence de nanoparticules, des altérations de la structure et des atteintes neuronales au niveau de l'hippocampe dose-dépendantes sont observées chez la souris pour des expositions de 0 – 2,5 - 5 – 10 mg/kg/j pendant 13 semaines aux nanoTiO₂ (Ze et al., 2014a). Les particules utilisées ont été caractérisées : 6,5 nm, structure anatase (100 %), aire de surface : 174,8 m²/g et potentiel zêta 7,57 mV. Les altérations structurelles de l'hippocampe sont dose dépendantes et correspondent à une raréfaction des cellules gliales, une réplication altérée des cellules gliales, diminution du volume des cellules, modification de la forme et dégénérescence des noyaux, œdème des cellules gliales. Une altération de la structure des cellules nerveuses de l'hippocampe incluant une apoptose a également été observée. Les effets rapportés sont associés à des altérations réversibles au test de mémoire spatiale. Cette étude montre que les nanoparticules passent la barrière hématoencéphalique et peuvent atteindre l'hippocampe. Ces effets restent peu marqués à la dose la plus faible qui est considérée comme un NOAEL.

De cette étude un **NOAEL de 2,5 mg/kg/j** et un **LOAEL de 5 mg/kg/j** peuvent être retenus pour des effets neurologiques chez la souris.

Evaluation de l'étude : la caractérisation des nanoparticules est bien renseignée. Le test suit les bonnes pratiques de laboratoire. Un suivi général de l'état de santé des animaux est réalisé avec des examens plus spécifiques concernant les effets neurologiques.

L'analyse comparée de ces résultats est présentée dans le tableau 3, elle montre que chacune des études n'a évalué que certains effets (rénaux, spléniques ou neurologiques) pour des protocoles expérimentaux proches et que le niveau de dose sans effet à retenir est 2,5 mg/kg/j pour des effets rénaux ou neurologiques pour des expositions subchroniques (Gui et al., 2011, Ze et al., 2014a).

Tableau 3 : Synthèse des études pouvant être utilisées pour l'élaboration d'une valeur pour une exposition voie orale

Espèce, sexe et conditions d'exposition	Concentrations testées au cours de l'étude	Description des particules	Doses critiques et effets associés	Référence
Souris CD-1 femelle, 1fois/j pendant 13 semaines	0 – 2,5 - 5 – 10 mg/kg/j	Anatase, 6,5 nm	LOAEL = 5 mg/kg/j NOAEL = 2,5 mg/kg/j effets rénaux	Gui <i>et al.</i> , 2011
Souris CD-1 femelle, 1fois/j pendant 2 – 4 – 6 – 8 – 10 - 13 semaines	10 mg/kg/j	Anatase, 5,5 nm	LOAEL = 10 mg/kg/j pour des effets spléniques	Sang <i>et al.</i> , 2013
Souris CD-1 femelle, 1fois/j - 13 semaines	0 – 2,5 - 5 – 10 mg/kg/j	Anatase, 6,5 nm	LOAEL = 5 mg/kg/j NOAEL = 2,5 mg/kg/j effets neurologiques	Ze <i>et al.</i> , 2014a

5.2 EFFETS GENOTOXIQUES ET CANCEROGENES

5.2.1 EFFETS GENOTOXIQUES

Les effets génotoxiques induits par les particules de TiO₂ sont très hétérogènes. Les résultats sont difficiles à interpréter car fortement influencés par les conditions expérimentales, le type de lignée cellulaire et le type de particules (taille et/ou surface spécifique, forme cristalline, présence ou absence d'enrobage...).

Malgré tout, les différents organismes (IARC, 2010 ; NIOSH, 2011) qui ont mené des analyses récentes concluent qu'au moins une part importante du mécanisme de cancérogenèse serait non génotoxique de type induction de dommages à l'ADN suggérant une génération d'espèces radicalaires de l'oxygène par les deux types de particules (fines et ultrafines) essentiellement lié à la taille et la surface des particules.

5.2.2 EFFETS CANCEROGENES

5.2.2.1 EXPOSITION PAR VOIE RESPIRATOIRE

5.2.2.1.1 EXPOSITION PAR INHALATION

- **Heinrich *et al.*, 1995**

Des rats Wistar femelles, des souris NMRI femelles et C57BL/6N femelles ont été exposés pendant 2 ans à des particules diesel, du noir de carbone et des particules ultrafine de TiO₂ (P25, Degussa, MMAD : 0,80 µm). Ils ont ensuite été maintenus dans un environnement d'air propre pendant 6 mois. Les particules de TiO₂ étaient un mélange anatase/rutile 80/20 avec des particules primaires de diamètre 15-40 nm. L'aérosol présentait un diamètre aérodynamique moyen de 1,5 µm et de surface 48 + 2 m²/g. Les animaux ont été exposés 18 h/j, 5 j/sem pendant 24 mois. Un lot témoin de 220 animaux a été exposé à de l'air propre. Le niveau d'exposition a été augmenté au cours de l'étude pour le noir de carbone et

le TiO₂ afin d'obtenir une charge pulmonaire similaire à celle des particules diesel. Pour le TiO₂ la concentration était de 7,2 mg.m⁻³ au cours des 4 premiers mois, puis de 14,8 mg.m⁻³ pendant 4 mois, et de 9,4 mg.m⁻³ pendant 16 mois. La concentration moyenne était de 7 – 11,6 – 10 mg.m⁻³ respectivement pour les particules diesel, le noir de carbone et le TiO₂.

Le suivi des animaux a inclus les différents éléments du suivi pulmonaire : la rétention pulmonaire, la clairance alvéolaire, le poids des poumons, l'analyse des lavages bronchoalvéolaires et l'histologie.

L'incidence des tumeurs pulmonaires chez ces rats a augmenté en fonction de l'accumulation des particules indépendamment du type de particules. Les agglomérats de particules ultrafines de carbone et de TiO₂ induisent un effet toxique sur les macrophages alvéolaires et la clairance pulmonaire. Ces effets sont également retrouvés avec la concentration en particules diesel la plus basse (0,8 mg.m⁻³). A ce niveau, il n'a pas été observé de tumeurs pulmonaires. Ces effets ne sont pas retrouvés chez les souris.

Après 30 mois, 32/100 rats traités au TiO₂ présentent des tumeurs pulmonaires (20 tumeurs bénignes des cellules squameuses, 3 carcinomes des cellules squameuses, 4 adénomes et 13 adénocarcinomes). L'incidence des tumeurs pulmonaires est 19/100 lorsque les tumeurs bénignes ne sont pas incluses.

C'est l'une des principales études retenues par l'IARC en 2010 pour la classification du TiO₂ en groupe 2B : cancérigène possible pour l'homme.

LOAEC de 10 mg.m⁻³ pour un effet toxique sur les macrophages alvéolaires et la clairance pulmonaire. Induction également de tumeurs pulmonaires.

Evaluation de l'étude : cette étude a été bien décrite et de bonne qualité. Une seule concentration a été testée ce qui ne permet pas l'établissement d'une relation dose-effet mais permet d'apporter des informations complémentaires à celles décrites précédemment pour des expositions sub-chroniques.

- **Lee et al., 1985**

Des rats ont été exposés par inhalation à 0 – 10 – 50 – 250 mg.m⁻³ de particules de TiO₂ (rutile, pureté 99,0 %) 6 h/j, 5 j/sem pendant 2 ans. Ces particules sont sphériques et présentent un diamètre aérodynamique moyen massique (MMD) de 1,5 à 1,7 µm. Environ 84 % des particules présentent un MMD < 13 µm. Il n'a pas été observé de signes cliniques anormaux, de modification du poids corporel ou d'excès de mortalité quel que soit les lots exposés. Les lots exposés présentent une légère augmentation de l'incidence des pneumonies, trachéites et rhinites avec une métaplasie de la cavité nasale antérieure. A 10 mg.m⁻³ les effets observés sont ceux d'une exposition aux poussières et correspondent à une infiltration de macrophages alvéolaires dans les canaux alvéolaires et une hyperplasie des pneumocytes de type II au niveau alvéolaire. Aux concentrations de 50 et 250 mg.m⁻³, des effets dose-dépendants correspondant à une accumulation de poussières, une réponse des macrophages spumeux, une hyperplasie des pneumocytes de type II, une protéinose alvéolaire, une bronchiolisation alvéolaire, des granulomes de cholestérol, une pleurésie localisée et une déposition de poussières dans les ganglions lymphatiques trachéobronchiques.

Les effets pulmonaires observés à 250 mg.m⁻³ sont en lien avec un dépassement des capacités de clairance pulmonaire. Des adénomes bronchioalvéolaires et des carcinomes des cellules squameuses cystiques kératinisées ont été observés à 250 mg.m⁻³. Ces effets ne sont pas retrouvés aux doses de 10 et 50 mg.m⁻³. Les tumeurs observées ne sont pas types habituellement retrouvés chez l'homme ce qui pose la question de la transposition de cet effet.

Evaluation de l'étude : manque de précision concernant la taille des particules qui pourraient être fines et non nanométriques.

Deux autres études menées avec des particules de TiO₂ non nanométriques pendant 2 ans chez des rats (Muhle, 1989 ; Thyssen, 1978) ont mis en évidence une inflammation pulmonaire mais pas de tumeur (ECHA, 2016).

5.2.2.1.2 EXPOSITION PAR VOIE INTRA-TRACHEALE

- **Pott et Roller, 2005- Mohr et al., 2006**

Il s'agit d'une étude pour une exposition intra-trachéale chez le rat qui a évalué les effets de 19 particules de différentes tailles et compositions. Cette analyse a été menée afin d'évaluer l'impact de la charge pulmonaire dans la genèse des cancers pulmonaires et de proposer une approche par modélisation. Parmi ces différentes particules 3 types de particules de TiO₂ (2 nanométriques et 1 micrométrique) ont été testées. La nanoparticule hydrophobique dont la structure cristalline n'est pas clairement précisée n'induit pas la formation de tumeurs. Les particules ultrafine et nanoparticulaire (P25 de Degussa) de structure cristalline majoritairement anatase entraînent une augmentation significative des tumeurs pulmonaires (adénomes et carcinomes malpighiens) 52,4 - 67,4 et 69,4 % pour les trois concentrations testées.

Evaluation de l'étude : cette étude n'a pas été construite pour évaluer les effets du TiO₂ mais pour évaluer le potentiel cancérigène de différents types de poussières. La description des particules n'est pas complète. Compte tenu du nombre de particules étudiées, les résultats bruts présentés sont limités aux seuls résultats de la cancérogenèse pulmonaire. Les résultats concernant le nanoTiO₂ montrent l'importance de l'enrobage de la particule dans sa réactivité. Cependant ces résultats sont difficiles extrapolable du fait de l'exposition par voie intratrachéale qui induit une charge pulmonaire ponctuelle importante et perturbe les capacités d'épuration pulmonaire.

5.2.2.2 EXPOSITION PAR VOIE ORALE

Aucun effet n'a été observé avec des particules de taille non précisée (IARC, 2010 ; INRS, 2013).

5.2.3 CLASSIFICATION

Les seuls éléments de classification disponibles prennent en compte le TiO₂ mais pas spécifiquement la forme nanométrique.

En 2010, l'IARC a classé le TiO₂ en groupe 2B : cancérigène possible pour l'homme en retenant l'absence d'évidence d'effet chez l'homme et une évidence suffisante chez l'animal. Le groupe de travail a considéré que compte tenu des

mécanismes d'action et la faible solubilité des particules, il n'est pas possible de proposer une classification au-delà du groupe 2B.

En 2016, une proposition de classification et étiquetage harmonisée déposée par l'ANSES auprès de l'ECHA en catégorie 1B, substance dont le potentiel cancérigène est supposé pour l'homme, est justifiée par une augmentation des tumeurs pulmonaires maligne et bénigne chez l'animal lors de deux études pour des expositions par inhalation et deux études par instillation intra-trachéale (ANSES, 2016). Dans la mesure, où les données disponibles ne permettent pas de relier ces effets à une caractéristique spécifique, cette classification est proposée pour l'ensemble des formes de TiO₂ pour des expositions uniquement par voie respiratoire.

5.3 EFFETS SUR LE DEVELOPPEMENT OU LA REPRODUCTION

5.3.1 EFFETS SUR LA FERTILITE

Les effets sur la reproduction ont été partiellement testés chez l'animal.

Deux études d'expositions répétées pendant 13 semaines ont évalué les effets d'une exposition intragastrique à 0 -2,5 – 5 -10 mg/kg/j aux nanoTiO₂ (forme anatase 5 - 6 nm) chez la souris (Zhao *et al.*, 2013 ; Gao *et al.*, 2013). Chez les femelles, une diminution de la fertilité (diminution du nombre de femelles gestantes et perturbations hormonales en cascades) et des atteintes de l'appareil reproducteur (diminution du poids des ovaires et atrésie folliculaire) sont rapportées (Zhao *et al.*, 2013). Chez les mâles, des effets sur l'appareil reproducteur (atteinte de la spermatogenèse) sont observés dès la dose de 2,5 mg/kg/j (Gao *et al.*, 2013).

5.3.2 EFFETS SUR LE DEVELOPPEMENT

Les études menées chez la souris rapportent des malformations embryonnaires *in utero* aux doses de 100 et 1 000 mg/kg des femelles gestantes au 9^{ème} jour de la gestation (Philbrook *et al.*, 2011), des retards de croissance des foetus, des altérations du développement cérébral et du comportement pour des expositions par inhalation des femelles à 40 mg/m³ du 8^{ème} au 18^{ème} jour de la gestation (Hougaard, 2010).

Chez le rat, il est fait état d'anomalies du développement pulmonaire pour une exposition par gavage à 200 mg/kg chez la femelle gestante du 6^{ème} au 12^{ème} jour de la gestation (Elbastawisy et Almasry, 2014).

Chez le rat pour une exposition par gavage à la dose de 100 mg/kg/j du 2^{ème} au 21^{ème} jours de la gestation, il a été observé des altérations au niveau de l'hippocampe chez le nouveau-né associées à des diminutions des performances de l'apprentissage et de la mémoire chez les jeunes (Mohammadipour *et al.*, 2014).

Du fait des limitations de données concernant les voies d'expositions habituelles, les études menées avec des voies non physiologiques sont également rapportées ici pour souligner les effets potentiels d'une exposition au nanoTiO₂.

L'injection sous-cutanée de particules de TiO₂ (57-70 nm, 20 – 25 m².g⁻¹, forme anatase) à des souris induit la formation d'agrégats de TiO₂ dans le cerveau au

niveau du bulbe olfactif et du cortex et des testicules. Les tubules séminifères présentent des altérations histologiques ; une diminution de la production de sperme est mise en évidence, ainsi qu'une baisse de la motilité des spermatozoïdes (INRS, 2013 ; Takeda, 2009).

L'administration intra-veineuse de 0,8 mg de TiO₂ à des souris (particules primaires de 35 nm, taille moyenne en suspension 217 nm, forme rutile) au 16 et 17^{ème} j de la gestation, entraîne chez les mères une diminution de poids corporel et de leur utérus, une diminution du poids des fœtus ainsi qu'une augmentation du nombre des résorptions fœtales (INRS, 2013 ; Yamashita *et al.*, 2011).

6. ETABLISSEMENT D'UNE RELATION DOSE EFFET

6.1 VOIE RESPIRATOIRE

La nature des nanoparticules rend difficile l'exercice consistant en l'établissement d'une relation dose-effet car contrairement aux substances chimiques dites « classiques », les effets des nanoparticules sont très dépendant de leurs caractéristiques physiques et de leur réactivité en lien avec notamment les conditions de préparation de la nanoparticule. De plus, la littérature ne rapporte qu'un nombre limité d'études directement utilisables (études *in vivo* pour des expositions par voie orale ou inhalation et pour des durées d'exposition sub-chronique ou chroniques). Enfin, ces études sont souvent limitées quant à la caractérisation physique de ces particules.

6.1.1 VALEUR POUR DES EXPOSITIONS PROFESSIONNELLES

A notre connaissance, l'organisme qui a proposé la démarche la plus aboutie pour l'établissement d'une relation dose effet pour des expositions par voie respiratoire est le NIOSH (2011). Cependant cette approche a été développée pour des expositions professionnelles et n'est pas directement être utilisable pour la construction d'une valeur pour la population générale. En effet, il existe des différences entre ces deux types de valeurs à plusieurs niveaux, dont les principales sont synthétisées dans le tableau 3, qui conduisent à la construction de valeurs différentes.

Tableau 4 : Comparaison des principales différences entre

Paramètre	Valeur professionnelle	Valeur population générale
Populations concernées	Adulte en capacité de travail	Toutes populations d'âge (nourrisson à personne âgée) et d'état de santé
Circonstances d'exposition	Au poste de travail	Multiples via la nourriture ou l'air inhalé mais aussi des comportements spécifiques : baignade ou ingestion chez les très jeunes enfants
Voies d'exposition	Essentiellement inhalation voire cutanée	Principalement voie orale et également inhalation
Fréquence de l'exposition	Intermittente Environ 8h/24h et 5j/7j	Continue 24h/24h et 7j/7j
Durée de l'exposition	Période de l'activité professionnelle Environ 40 ans	Vie entière

Le NIOSH considère que le TiO₂ ainsi que les autres particules fines et ultrafines faiblement solubles et de faible toxicité présentent une relation dose-réponse cohérente avec la survenue d'effets pulmonaires chez le rat, ces effets incluant une inflammation pulmonaire persistante et des tumeurs pulmonaires lorsque la dose est exprimée en surface de particules. La surface des particules est supérieure pour les particules ultrafines par rapport aux particules fines. Les données qui ont été considérées comme les plus pertinentes pour évaluer les risques chez les travailleurs sont celles issues d'une étude de cancérogenèse chez le rat et les souris (Heinrich *et al.*, 1995, décrite au §5.2.2.1.1) au cours de laquelle une augmentation statistiquement significative des adénomes pulmonaires a été observée. Le NIOSH a considéré que l'exposition aux nanoTiO₂ présentait un potentiel cancérogène pour le travailleur.

Par ailleurs, du fait de l'absence de tumeurs chez les animaux au cours d'études de cancérogenèse avec des particules fines de TiO₂, sauf aux fortes concentrations, le NIOSH considère que les effets observés chez l'animal exposé à des particules de TiO₂ fines et ultrafines sont cohérents avec un continuum de la réponse biologique au TiO₂ basée sur la surface des particules. Ainsi, toutes les tumeurs induites par des expositions aux particules de TiO₂ (fines et ultrafines) suivent la même relation dose-effet si la dose est exprimée en surface des particules dans les poumons. Toutefois, comme il existe une différence dans les effets induits entre les deux types de particules, la modélisation tient compte de l'ensemble des particules mais les résultats sont exprimés indépendants en fonction du type de particules.

6.1.2 EXPOSITIONS ENVIRONNEMENTALES : PROPOSITION DE L'INERIS

A notre connaissance, il n'existe pas de valeurs toxicologiques de référence disponibles pour des expositions environnementales par voie respiratoire aux nanoTiO₂.

Dans le cas présent, compte tenu de l'insuffisance de la base de données disponible et des incertitudes concernant les effets des différentes formes de nanoparticules de TiO₂ en lien avec leurs caractéristiques, il a été retenu d'appliquer la méthodologie habituelle de construction de valeurs repères en toxicologie (AFSSET, 2007, 2010 ; ANSES, 2015) malgré les limites de cette démarche qui devra évoluer pour mieux prendre en compte les nanoparticules.

L'analyse des données disponibles montre que le principal effet décrit correspond à une atteinte pulmonaire de type inflammatoire avec des effets cytotoxiques et prolifératifs à l'origine de lésions histopathologiques généralement réversibles mais pouvant conduire à la formation de tumeurs en cas d'exposition prolongée. Ces effets sont rapportés pour différentes conditions d'administration (inhalation, intratrachéale notamment). Ces effets induits par les nanoparticules sont plus marqués qu'avec les particules fines. L'espèce la plus sensible semble être le rat.

Il est cependant à noter que plusieurs études, notamment celles réalisées par voie intranasale, ont mis en évidence d'autres types d'effets particulièrement au niveau neurologique. A notre connaissance, ces effets n'ont pas été recherchés pour les autres voies d'expositions, excepté au cours des études développementales. Ces dernières ont mis en évidence des effets potentiels chez le fœtus. La voie intranasale n'est pas une voie habituelle d'étude mais pourrait être voie possible pour des expositions environnementales.

6.1.2.1 EFFETS A SEUIL

- **Choix de l'étude de référence**

Pour la construction de valeur toxicologique, les seules données utilisables sont en principe celles issues d'études *in vivo* pour une exposition par inhalation. Parmi les études disponibles, seules les études expérimentales mettent en évidence une relation dose-effet exploitable pour le calcul d'une valeur. Une seule étude pour des expositions chroniques par inhalation est disponible mais ne rapporte pas de relation dose-effet. Plusieurs études sont disponibles pour des expositions sub-chroniques par inhalation et peuvent être utilisées (§5.1.1.1.2.). Ces études retiennent le même effet critique relatif aux effets pulmonaires et compatibles avec le profil toxicologique de la substance. L'étude présentant les niveaux d'effets les plus faibles est celle de Bermudez *et al.*, 2004. Comme présenté dans le tableau 2, cette étude montre que les effets les plus sensibles sont ceux observés chez les rats femelles avec une nanoparticule bien décrite (P25 Degussa, diamètre 21 nm, anatase/rutile (75/15)) pour laquelle des mesures ont été réalisées au cours de l'étude ainsi qu'une mesure de la charge pulmonaire chez les animaux exposés. Il s'agit d'une étude pour une exposition sub-chronique avec une période d'observation post-exposition.

Cette étude est de bonne qualité et propose une relation dose effet claire ainsi que des résultats sur plusieurs espèces. La nanoparticule utilisée est assez bien décrite, de taille moyenne diamètre 21 nm correspondant à un mélange anatase rutile.

Ces résultats sont confortés par ceux d'autres études réalisées pour des durées d'exposition plus courtes (subaiguës) mais aussi une étude chronique réalisée avec la même nanoparticule pour un seul niveau de concentration (Heinrich *et al.*, 1995) et une étude présentant une relation dose-effet pour une exposition aux particules fines (non nanométriques, Bermudez *et al.*, 2002).

- **Choix de l'effet critique**

L'effet critique retenu est un effet pulmonaire : une augmentation du nombre de neutrophiles, une prolifération progressive de l'épithélium et une cytotoxicité. Les altérations étant très faibles à la concentration la plus faible (0,5 mg/m³), cette concentration peut être retenue comme la concentration sans effet nocif (NOAEC).

De façon générale, lorsque cela est possible il est préférable de calculer une benchmark dose, valeur statistique qui prend en compte l'ensemble de la dose – réponse plutôt que d'utiliser la dose expérimentale sans effets (NOAEC). Pour cette étude, l'amplitude de la dose réponse testée (3 concentrations) est un peu restreinte. Par ailleurs, et compte tenu des incertitudes inhérentes à la construction de cette valeur cette approche n'a pas été retenue.

Il peut être noté que dans la mesure où l'effet retenu est mieux corrélé à la charge pulmonaire qu'à la concentration, il pourrait être envisagé une approche en tenant compte de la charge pulmonaire notamment afin de calculer la concentration équivalente de chez l'homme. Les paramètres de conversion sont toutefois insuffisamment caractérisés à ce stade.

- **Calcul de la valeur**

Ajustement de la concentration et calcul d'une concentration équivalente chez l'homme

A partir de la valeur de NOAEC retenue de 0,5 mg/m³, un ajustement au temps est réalisé pour passer d'une exposition discontinue à continue (6h/24h x 5j/7j), soit une concentration ajustée :

$$\text{NOAEC}_{\text{ADJ}} = 0,5 \text{ mg/m}^3 \times 6 \text{ h}/24 \text{ h} \times 5 \text{ j}/7 \text{ j} = 0,089 \text{ mg/m}^3$$

Le calcul de la concentration équivalente pour l'homme est réalisé en considérant qu'il s'agit d'une forme particulaire et que l'effet critique retenu est un effet pulmonaire. Selon les recommandations de l'US EPA (1994) cela conduit à retenir la formule : $\text{NOAEC}_{\text{HEC}} = \text{NOAEC} \times \text{RDDRr}^6$.

Le RDDRr peut être calculé au moyen d'un logiciel et est dépendant du diamètre aérodynamique moyen des particules, toutefois ce logiciel n'a probablement pas été conçu pour les nanoparticules et ne prend probablement pas en compte les possibilités d'agglomération fréquentes avec les particules de cette taille. Dans ces conditions, il n'a pas été possible de calculer de concentration équivalente pour l'homme. Celui-ci est généralement égal ou supérieur à 1 et l'absence de conversion est protectrice.

⁶ Le RDDRr est un facteur multiplicatif utilisé pour ajuster une concentration d'exposition chez l'animal à une concentration équivalente pour l'homme pour la même région extrathoracique, trachéobronchiale et pulmonaire.

Choix des facteurs d'incertitude

Compte tenu des incertitudes résiduelles, des facteurs d'ajustement doivent être appliqués pour prendre en compte l'extrapolation de l'animal à l'homme (3), la variabilité au sein de l'espèce humaine (10), pour prendre en compte la durée de l'exposition qui est insuffisante, c'est-à-dire l'extrapolation de sub-chronique à chronique (3) ainsi que les limites de la base de données notamment en ce qui concerne les effets sur le développement et les effets neurologiques ainsi que plus généralement les connaissances sur les modes d'action du nano-TiO₂ (10).

Un facteur de 3 a été considéré comme suffisant pour l'extrapolation de l'animal à l'homme car l'effet critique retenu est une réaction inflammatoire pulmonaire chez le rat. Compte-tenu de l'anatomie du rat, il est probable qu'il soit au moins aussi sensible que l'homme. De plus, il s'agit d'un effet local ce qui exclut les différences de métabolisation.

Aucun facteur n'a été retenu pour prendre en compte la variabilité des nanoparticules, car celle utilisée dans l'étude de taille intermédiaire et de composition majoritairement anatase devrait correspondre à une réactivité raisonnablement représentative des différentes formes.

Un facteur d'incertitude global de $3 \times 10 \times 3 \times 10 = 900$ est donc appliqué.

Valeur proposée : $\text{NOAEC}_{\text{ADJ}} \times 1/900 = 0,089 \text{ mg/m}^3 \times 1/900 = 1.10^{-4} \text{ mg/m}^3 = 0,1 \text{ } \mu\text{g/m}^3$

6.1.2.2 EFFETS SANS SEUIL

Les analyses menées par l'IARC et l'ANSES ont montré que les nanoparticules de TiO₂ étaient des cancérrogènes possibles. Même s'il existe des éléments relatifs à la génération d'espèces radicalaires de l'oxygène et donc en faveur d'un mécanisme indirect de genèse des cancers correspondant à un mécanisme non génotoxique, ces éléments ne sont pas actuellement suffisants complets pour permettre d'exclure complètement le mécanisme génotoxique.

Dans son approche de développement de valeur pour des expositions professionnelles, le NIOSH a construit une valeur pour des expositions professionnelles sans seuil de dose mais les résultats sont plus élevés que ceux obtenus pour des effets à seuil. Ce qui tente à montrer que cet aspect doit être réétudié.

Pour la construction d'une valeur, la seule étude de cancérogenèse disponible est celle de Heinrich *et al.*, 1995. Cette étude réalisée avec la nanoparticule de Degussa n'a testé qu'une concentration, ce qui rend difficile la modélisation de la réponse et le calcul d'une valeur sans seuil. Dans ces conditions, **il n'est pas possible de proposer une valeur à ce jour.**

6.2 VOIE ORALE

6.2.1 REFLEXION POUR LES EXPOSITIONS VIA L'ALIMENTATION

Le TiO₂ est largement utilisé comme additif alimentaire E171. Différentes évaluations ont été menées par le JEFCA et l'EFSA. La plus récente de l'EFSA (2016) rappelle que la composition du E171 renfermant une fraction limitée de particules de TiO₂ de taille nanométrique n'impose pas de considérer le E171 comme une nanoparticule. Dans son analyse menée à la fois sur les formes

micrométriques et nanométriques, l'EFSA souligne les limitations de la base de données concernant les études disponibles utilisables pour la dérivation d'une dose journalière admissible.

Il considère que le TiO₂ ne doit pas être considéré comme un génotoxique pour son utilisation comme additif alimentaire. A partir des études de cancérogenèse menées avec une particule dont la taille n'est pas précisée, le panel d'expert retient comme NOAEL la dose de 2 250 mg TiO₂ /kg pc /j chez les rats mâles ce qui correspond à la dose la plus élevée testée. Il considère également que les études disponibles ont identifié de potentiels effets sur le développement et/ou la reproduction mais que les données disponibles ne permettent pas de dériver une valeur.

6.2.2 EXPOSITIONS ENVIRONNEMENTALES : PROPOSITION DE L'INERIS

A notre connaissance, il n'existe pas de valeurs toxicologiques de référence disponibles pour des expositions par voie orale aux nanoTiO₂.

Dans le cas présent, compte tenu de l'insuffisance de la base de données disponibles et des incertitudes concernant les effets des différentes nanoparticules de TiO₂ en lien avec leurs caractéristiques, il a été retenu d'appliquer la méthodologie habituelle de construction de valeurs repères en toxicologie (AFSSET, 2007, 2010, ANSES, 2015) malgré les limites de cette démarche.

Les études de cinétiques ont mis en évidence une adsorption limitée des nanoparticules de TiO₂ par voie orale. Les études disponibles pour des expositions par voie orale ne suivent pas lignes directrices et n'ont pas été menées en vue de l'établissement d'une relation dose-effet. Elles sont notamment limitées en termes d'investigation à un type d'effet spécifique. Sur la base des données disponibles, les effets restent limités. Il semblerait que les nanoparticules les plus petites (taille 5 à 6 nm) et de forme cristalline anatase soient à l'origine des principaux effets observés et que la souris soit l'espèce la plus sensible. Ces effets sont généralement caractérisés par une réaction de type inflammatoire pouvant induire des altérations tissulaires et nécroses. Différents organes présentent des altérations : rein, système nerveux central, organes de la reproduction.

6.2.2.1 EFFETS A SEUIL

- **Choix de l'effet critique**

Très peu d'études sont disponibles pour des expositions par voie orale. Il est rapporté des effets hépatiques, rénaux, cardiaques et neurologiques correspondant à des altérations de biomarqueurs précoces observés de manière dose dépendante. Les études pour des durées d'expositions les plus longues sont des études subchroniques par voie intragastrique qui montrent la survenue d'effets rénaux et neurologiques (Gui *et al.*, 2011, Ze *et al.*, 2014a). Bien qu'elles ne suivent pas les lignes directrices de l'OCDE, ces deux études sont de bonne qualité. De ces études, un NOAEL de 2,5 mg/kg/j pour des effets rénaux ou neurologiques est retenu.

- **Calcul de la valeur**

Application des facteurs d'incertitude

Compte tenu des incertitudes résiduelles, des facteurs d'ajustement doivent être appliqués pour prendre en compte l'extrapolation de l'animal à l'homme (10), la variabilité au sein de l'espèce humaine (10), pour prendre en compte la durée de l'exposition qui est insuffisante, extrapolation de sub-chronique à chronique (3), pour prendre en compte d'effet potentiel sur l'appareil reproducteur (3).

Aucun facteur n'a été retenu pour prendre en compte la variabilité des nanoparticules, car celle utilisée dans les deux études est de petite taille et de composition majoritairement anatase devrait correspondre à une forte réactivité représentative des différentes formes.

Valeur proposée : $\text{NOAEL} \times 1/900 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ mg/kg/j} = 3 \text{ } \mu\text{g/kg/j}$

6.2.2.2 EFFETS SANS SEUIL

Les rares données disponibles ne semblent pas indiquer la genèse de cancers pour des expositions par voie orale.

7. VALEURS DE REFERENCE

7.1 EXPOSITION PROFESSIONNELLE (INRS, 2013, 2016 ; NIOSH, 2011)

En France, la valeur indicative recommandée est la **VME de 10 mg.m⁻³ pour les poussières de dioxyde de titane inhalables**. Cette valeur, issue d'une circulaire de 1987, est toujours celle retenue actuellement (INRS, 2016).

Plusieurs pays ont développé des valeurs pour le TiO₂ ultra-fin, les plus récentes sont celles développées par les Etats-Unis et le Japon.

Depuis 2011, le NIOSH recommande pour le dioxyde de titane des valeurs différentes en fonction de la taille des particules :

- **dioxyde de titane fin** (fraction alvéolaire, particules primaires de diamètre > 100 nm) : **VME de 2,4 mg.m⁻³**,
- **dioxyde de titane ultra-fin** (fraction alvéolaire, particules primaires de diamètre < 100 nm) : **VME de 0,3 mg.m⁻³**. Cette valeur est applicable aux particules agglomérées/agrégées et même si les agglomérats ou agrégats ont un diamètre > 100 nm. Cette valeur est établie pour prendre en compte les effets cancérogènes pour un risque de cancer de 1/1000.

Au Japon le « New energy and industrial technology development Organization » (NEDO), a développé une valeur pour le **dioxyde de titane ultra-fin** (fraction alvéolaire) : **VME de 0,6 mg.m⁻³**

Le **Comité Scientifique européen** en matière de limites d'exposition professionnelle à des agents chimiques (SCOEL) prépare une monographie (SUM/185) qui pourrait proposer une valeur pour des fractions nanoparticulaires (INRS, 2016).

En 2016, l'**INRS** suggère la possibilité de retenir pour la France, une valeur qui pourrait être construite sur la base des calculs du NIOSH et dont la valeur pourrait être 0,07 mg.m⁻³ pour un risque de cancer de 1/10 000 ; tout en considérant que le NIOSH a lui-même estimé que le risque réel de cancer est très inférieur au risque calculé de 0,3 mg.m⁻³.

7.2 EXPOSITION ENVIRONNEMENTALE : PROPOSITIONS DE L'INERIS

A notre connaissance, il n'existe pas de valeurs toxicologiques de référence disponibles pour des expositions par voies orale ou respiratoire aux nanoTiO₂. Afin de pouvoir prévenir les populations exposées des risques potentiels aux nanoparticules de TiO₂, l'INERIS a développé des valeurs repère pour les deux voies d'exposition.

7.2.1 EFFETS A SEUIL

L'INERIS propose deux valeurs pour des expositions chroniques à seuil une pour la voie respiratoire et l'autre pour la voie orale.

- **Voie respiratoire : 0,1 µg/m³**

Cette valeur a été établie à partir de l'étude sub-chronique de Bermudez *et al.*, 2004 en retenant un NOAEC de 0,5 mg/m³ pour une augmentation du nombre de neutrophiles, une cytotoxicité et une prolifération de l'épithélium pulmonaire. La nanoparticule de TiO₂ utilisée est la P25 de Degussa. Un facteur d'incertitude 900 a été appliqué pour tenir compte de l'extrapolation de l'animal à l'homme, de la variabilité au sein de la population humaine, l'extrapolation des données d'une exposition sub-chronique à chronique et pour prendre en compte les limites de la base de données en ce qui concerne les effets sur le développement, les effets neurologiques et le mécanisme d'action du nano-TiO₂.

- **Voie orale : 3 µg/kg/j**

Cette valeur est établie à partir de deux études sub-chroniques chez la souris (Gui *et al.*, 2011, Ze *et al.*, 2014a) en retenant la survenue d'effets rénaux (inflammation néphrique, nécrose cellulaire et des dysfonctionnements de type altération de l'expression des cytokines de l'inflammation et réduction des mécanismes de détoxification des nanoTiO₂) et neurologiques (des altérations de la structure et des atteintes neuronales au niveau de l'hippocampe). Les particules utilisées ont été caractérisées : 6,5 nm, structure anatase (100 %), aire de surface : 174,8 m²/g et potentiel zêta 7,57 mV

Un facteur d'incertitude de 900 est retenu pour prendre en compte l'extrapolation des données de l'animal à l'homme, la variabilité au sein de l'espèce humaine, l'extrapolation d'une durée d'exposition sub-chronique à chronique, de potentiel effet sur l'appareil reproducteur.

Il est rappelé que compte tenu de la grande variation des caractéristiques des différentes nanoparticules de TiO₂ et de leurs réactivités associées ces valeurs sont indicatives et ne permettent pas de couvrir l'ensemble des potentiels effets induits par les différentes formes de nanoparticules de TiO₂. De plus, ces valeurs sont provisoires et pourront être révisées en fonction de l'évolution des connaissances relatives aux effets des nanoparticules de TiO₂ ou aux méthodes de calcul.

7.2.2 EFFETS CANCEROGENES

Pour les effets cancérigènes, aucune valeur supplémentaire n'a été développée. Bien qu'il ne soit pas possible de confirmer de façon certaine que les effets cancérigènes observés seraient uniquement de type « à seuil », la plupart des organismes s'étant prononcés à ce sujet (NIOSH, INRS) vont toutefois dans ce sens. Sur la base des connaissances actuelles, les valeurs proposées pour des effets systémiques seraient du même ordre de grandeur que celles qui protégeraient des effets cancérigènes.

8. BIBLIOGRAPHIE

Afssaps (2011) - Etat des connaissances relatif aux nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc dans les produits cosmétiques en termes de pénétration cutanée, de génotoxicité et de cancérogenèse. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/af86f9684f0e2810a7cf1d5b0cefb0d5.pdf54p

AFSSET (2007) - Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail Relatif à la proposition d'une méthode de construction de valeurs toxicologiques de référence pour les substances toxiques sur la reproduction et le développement. Saisine Afsset n° 2003/AS03. Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail. MAISONS-ALFORT. <https://www.anses.fr/fr/documents/CHIM2003etAS03Ra.pdf>

AFSSET (2010) - Valeurs toxicologiques de référence (VTR). Méthode de construction de Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances chimiques cancérogènes. Auto-Saisine Afsset n° « 2004/AS16 ». Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail. Maisons-Alfort. <https://www.anses.fr/documents/CHIM2004etAS16Ra.pdf>

ANSES (2015) - Valeurs toxicologiques de référence (VTR) Guide d'élaboration de VTR. Auto-saisine n°2012-SA-0275 Seconde édition. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Maisons-Alfort. <https://www.anses.fr/system/files/VTR2012SA0275Ra.pdf>

ANSES (2016) - Mise en consultation publique de la proposition de l'Anses pour un classement du dioxyde de titane en tant que cancérogène par inhalation. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail <https://www.anses.fr/fr/content/mise-en-consultation-publique-de-la-proposition-de-l%E2%80%99anses-pour-un-classement-du-dioxyde-de>.

Baggs R.B., Ferin J. and Oberdörster G. (1997) - Regression of Pulmonary Lesions Produced by Inhaled Titanium Dioxide in Rats. *Veterinary Pathology Online*, **34**, 6, 592-597.

Bermudez E., Mangum J.B., Asgharian B., Wong B.A., Reverdy E.E., Janszen D.B., Hext P.M., Warheit D.B. and Everitt J.I. (2002) - Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci*, **70**.

Bermudez E., Mangum J.B., Wong B.A., Asgharian B., Hext P.M., Warheit D.B. and Everitt J.I. (2004) - Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci*, **77**.

Cho W.S., Duffin R., Poland C.A., Howie S.E.M., MacNee W., Bradley M., Megson I.L. and Donaldson K. (2010) - Metal Oxide Nanoparticles Induce Unique Inflammatory Footprints in the Lung: Important Implications for Nanoparticle Testing. *Environmental Health Perspectives*, **118**, 12, 1699-1706.

Cho W.S., Kang B.C., Lee J.K., Jeong J., Che J.H. and Seok S.H. (2013) - Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Particle and Fibre Toxicology*, **10**.

Creutzenberg O., Bellmann B., Heinrich U., Fuhst R., Koch W. and Muhle H. (1990) - Clearance and retention of inhaled diesel exhaust particles, carbon black, and titanium dioxide in rats at lung overload conditions. *Journal of Aerosol Science*, **21**, Supplement 1, S455-S458.

EFSA (2016) - EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food). Scientific Opinion on the re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive. European Food Safety Authority. <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/454583p>

Elbastawisy Y.M. and Almasry S.M. (2014) - Histomorphological evaluation of maternal and neonatal distal airspaces after maternal intake of nanoparticulate titanium dioxide: an experimental study in Wistar rats. *Journal of Molecular Histology*, **45**, 1, 91-102.

Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Sch, xfc, rch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Hof V.I., Heyder J. and Gehr P. (2005) - Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environmental Health Perspectives*, **113**, 11, 1555-1560.

Grassian V.H., O'Shaughnessy P.T., Adamcakova-Dodd A., Pettibone J.M. and Thorne P.S. (2007) - Inhalation exposure study of Titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environmental Health Perspectives*, **115**.

Gui S., Zhang Z., Zheng L., Cui Y., Liu X., Li N., Sang X., Sun Q., Gao G., Cheng Z., Cheng J., Wang L., Tang M. and Hong F. (2011) - Molecular mechanism of kidney injury of mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, **195**, 365-370.

Heinrich U., Fuhst R., Rittinghausen S., Creutzenberg O., Bellmann B., Koch W. and Levsen K. (1995) - Chronic Inhalation Exposure of Wistar Rats and two Different Strains of Mice to Diesel Engine Exhaust, Carbon Black, and Titanium Dioxide. *Inhalation Toxicology*, **7**, 4, 533-556.

Höhr D., Steinfartz Y., Schins R.P.F., Knaapen A.M., Martra G., Fubini B. and Borm P.J.A. (2002) - The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **205**, 3, 239-244.

Hougaard K.S. (2010) - Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Part. Fibre Toxicol.*, **7**, 16.

Hu R., Gong X., Duan Y., Li N., Che Y., Cui Y., Zhou M., Liu C., Wang H. and Hong F. (2010) - Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO₂ nanoparticles. *Biomaterials*, **31**, 31, 8043-8050.

Hu R., Zheng L., Zhang T., Gao G., Cui Y., Cheng Z., Cheng J., Hong M., Tang M. and Hong F. (2011) - Molecular mechanism of hippocampal apoptosis of mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, **191**, 1–3, 32-40.

Husain M., Saber A.T., Guo C., Jacobsen N.R., Jensen K.A., Yauk C.L., Williams A., Vogel U., Wallin H. and Halappanavar S. (2013) - Pulmonary instillation of low doses of titanium dioxide nanoparticles in mice leads to particle retention and gene expression changes in the absence of inflammation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **269**, 3, 250-262.

IARC (2010) - IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer, vol 93
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/mono93.pdf>.

INERIS (2016) - Élaboration, de valeurs « guides » préliminaires en toxicologie et écotoxicologie pour le cas des nanoparticules de dioxyde de titane. Sélection des critères nécessaires à l'évaluation de la qualité des données. Institut National de l'Environnement Industriel et des risques. NOTE D'AVANCEMENT - DRC-16-157027-02700A.

INRS (2013) - Fiche toxicologique FT291 - Dioxyde de titane. Institut National de Recherche et de Sécurité .
http://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_291-2/FicheTox_291.pdf

INRS (2016) - Notes techniques - Dioxyde de titane nanométrique: de la nécessité d'une valeur limite d'exposition professionnelle. Hygiène et sécurité du travail - N° 242. Institut National de Recherche et de Sécurité .
<http://www.inrs.fr/dms/inrs/CataloguePapier/HST/TI-NT-36/nt36.pdf>.

Jonasson S., Gustafsson Å., Koch B. and Bucht A. (2013) - Inhalation exposure of nano-scaled titanium dioxide (TiO₂) particles alters the inflammatory responses in asthmatic mice. *Inhalation Toxicology*, **25**, 4, 179-191.

Jones K., Morton J., Smith I., Jurkschat K., Harding A.-H. and Evans G. (2015) - Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, **233**, 2, 95-101.

Kobayashi N., Naya M., Endoh S., Maru J., Yamamoto K. and Nakanishi J. (2009) - Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology*, **264**, 1–2, 110-118.

Kwon S., Yang Y.-S., Yang H.-S., Lee J., Kang M.-S., Lee B.-s., Lee K. and Song C.-W. (2012) - Nasal and Pulmonary Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Rats *Toxicol. Res.*, **28**, 4, 217-224.

- Lee K.P., Trochimowicz H.J. and Reinhardt C.F.** (1985) - Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **79**, 2, 179-192.
- Li J., Li Q., Xu J., Li J., Cai X., Liu R., Li Y., Ma J. and Li W.** (2007) - Comparative study on the acute pulmonary toxicity induced by 3 and 20 nm TiO₂ primary particles in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **24**, 3, 239-244.
- Li Y., Li J., Yin J., Li W., Kang C., Huang Q. and Li Q.** (2010) - Systematic Influence Induced by 3 nm Titanium Dioxide Following Intratracheal Instillation of Mice. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **10**, 12, 8544-8549.
- Liu R., Yin L., Pu Y., Liang G., Zhang J., Su Y., Xiao Z. and Ye B.** (2009) - Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. *Progress in Natural Science*, **19**, 5, 573-579.
- Ma-Hock L., Burkhardt S., Strauss V., Gamer A.O., Wiench K., van Ravenzwaay B. and Landsiedel R.** (2009) - Development of a Short-Term Inhalation Test in the Rat Using Nano-Titanium Dioxide as a Model Substance. *Inhalation Toxicology*, **21**, 2, 102-118.
- Mohammadipour A., Fazel A., Haghiri H., Motejaded F., Rafatpanah H., Zabihi H., Hosseini M. and Bideskan A.E.** (2014) - Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **37**, 2, 617-625.
- Mohr U., Ernst H., Roller M. and Pott F.** (2006) - Pulmonary tumor types induced in Wistar rats of the so-called "19-dust study". *Experimental and Toxicologic Pathology*, **58**, 1, 13-20.
- Nemmar A., Melghit K. and Ali B.H.** (2008) - The Acute Proinflammatory and Prothrombotic Effects of Pulmonary Exposure to Rutile TiO₂ Nanorods in Rats. *Experimental Biology and Medicine*, **233**, 5, 610-619.
- Nemmar A., Melghit K., Al-Salam S., Zia S., Dhanasekaran S., Attoub S., Al-Amri I. and Ali B.H.** (2011) - Acute respiratory and systemic toxicity of pulmonary exposure to rutile Fe-doped TiO₂ nanorods. *Toxicology*, **279**, 1-3, 167-175.
- NIOSH** (2011) - Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health. www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf.
- Noël A., Charbonneau M., Cloutier Y., Tardif R. and Truchon G.** (2013) - Rat pulmonary responses to inhaled nano-TiO₂: effect of primary particle size and agglomeration state. *Particle and Fibre Toxicology*, **10**, 1, 1-18.
- Nurkiewicz T.R., Porter D.W., Hubbs A.F., Cumpston J.L., Chen B.T., Frazer D.G. and Castranova V.** (2008) - Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction. *Particle and Fibre Toxicology*, **5**, 1, 1-12.
- Nurkiewicz T.R., Porter D.W., Hubbs A.F., Stone S., Chen B.T., Frazer D.G., Boegehold M.A. and Castranova V.** (2009) - Pulmonary Nanoparticle Exposure Disrupts Systemic Microvascular Nitric Oxide Signaling. *Toxicological Sciences*.

Oberdorster G., Ferin J. and Lehnert B.E. (1994) - Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect*, **102**.

Park E.-J., Yoon J., Choi K., Yi J. and Park K. (2009) - Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology*, **260**, 1–3, 37-46.

Philbrook N.A., Winn L.M., Afrooz A.R.M.N., Saleh N.B. and Walker V.K. (2011) - The effect of TiO₂ and Ag nanoparticles on reproduction and development of *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **257**, 3, 429-436.

Pott F. and Roller M. (2005) - Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur J Oncol*, **10**, 4, 249-281.

Rossi E., Pylkkänen L., Koivisto A., Vippola M., Jensen K., Miettinen M., Sirola K., Nykäsenoja H., Karisola P., Stjernvall T., Vanhala E., Kiilunen M., Pasanen P., Mäkinen M., Hämeri K., Joutsensaari J., Tuomi T., Jokiniemi J., Wolff H., Savolainen K., Matikainen S. and Alenius H. (2009) - Airway exposure to silica coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicological Sciences*.

Rossi E.M., Pylkkänen L., Koivisto A.J., Vippola M., Jensen K.A., Miettinen M., Sirola K., Nykasenoja H., Karisola P., Stjernvall T., Vanhala E., Kiilunen M., Pasanen P., Makinen M., Hameri K., Joutsensaari J., Tuomi T., Jokiniemi J., Wolff H., Savolainen K., Matikainen S. and Alenius H. (2010a) - Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci*, **113**.

Rossi E.M., Pylkkänen L., Koivisto A.J., Nykäsenoja H., Wolff H., Savolainen K. and Alenius H. (2010b) - Inhalation exposure to nanosized and fine TiO₂ particles inhibits features of allergic asthma in a murine model. *Particle and Fibre Toxicology*, **7**, 1, 1-14.

Sadrieh N., Wokovich A.M., Gopee N.V., Zheng J., Haines D., Parmiter D., Siitonen P.H., Cozart C.R., Patri A.K., McNeil S.E., Howard P.C., Doub W.H. and Buhse L.F. (2010) - Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide (TiO₂) from Sunscreen Formulations containing Nano- and Sub-Micron-Size TiO₂ Particles. *Toxicological Sciences*.

Sang X., Li B., Ze Y., Hong J., Ze X., Gui S., Sun Q., Liu H., Zhao X., Sheng L., Liu D., Yu X., Wang L. and Hong F. (2013) - Toxicological Mechanisms of Nanosized Titanium Dioxide-Induced Spleen Injury in Mice after Repeated Peroral Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**, 23, 5590-5599.

Shi H., Magaye R., Castranova V. and Zhao J. (2013) - Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, **10**, 1, 1-33.

Sun Q., Tan D., Ze Y., Sang X., Liu X., Gui S., Cheng Z., Cheng J., Hu R., Gao G., Liu G., Zhu M., Zhao X., Sheng L., Wang L., Tang M. and Hong F. (2012) - Pulmotoxicological effects caused by long-term titanium dioxide nanoparticles exposure in mice. *Journal of Hazardous Materials*, **235–236**, 47-53.

Takeda K. (2009) - Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J. Health Sci.*, **55**, 95-102.

Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H., Wang T., Ma Y., Jia G., Gao Y., Li B., Sun J., Li Y., Jiao F., Zhao Y. and Chai Z. (2007) - Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters*, **168**, 2, 176-185.

Wang J., Chen C., Liu Y., Jiao F., Li W., Lao F., Li Y., Li B., Ge C., Zhou G., Gao Y., Zhao Y. and Chai Z. (2008a) - Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. *Toxicology Letters*, **183**, 1–3, 72-80.

Wang J., Liu Y., Jiao F., Lao F., Li W., Gu Y., Li Y., Ge C., Zhou G., Li B., Zhao Y., Chai Z. and Chen C. (2008b) - Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology*, **254**, 1–2, 82-90.

Wang Y., Chen Z., Ba T., Pu J., Chen T., Song Y., Gu Y., Qian Q., Xu Y., Xiang K., Wang H. and Jia G. (2013) - Susceptibility of Young and Adult Rats to the Oral Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Small*, **9**, 9-10, 1742-1752.

Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S.-i., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S. and Tsutsumi Y. (2011) - Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nano*, **6**, 5, 321-328.

Yu K.-N., Sung J.H., Lee S., Kim J.-E., Kim S., Cho W.-Y., Lee A.Y., Park S.J., Lim J., Park C., Chae C., Lee J.K., Lee J., Kim J.-S. and Cho M.-H. (2015) - Inhalation of titanium dioxide induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and inflammation in mice. *Food and Chemical Toxicology*, **85**, 106-113.

Ze X., Su M., Zhao X., Jiang H., Hong J., Yu X., Liu D., Xu B., Sheng L., Zhou Q., Zhou J., Cui J., Li K., Wang L., Ze Y. and Hong F. (2014d) - TiO₂ nanoparticle-induced neurotoxicity may be involved in dysfunction of glutamate metabolism and its receptor expression in mice. *Environmental Toxicology*, n/a-n/a.

Ze Y., Zheng L., Zhao X., Gui S., Sang X., Su J., Guan N., Zhu L., Sheng L., Hu R., Cheng J., Cheng Z., Sun Q., Wang L. and Hong F. (2013) - Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere*, **92**, 9, 1183-1189.

Ze Y., Sheng L., Zhao X., Ze X., Wang X., Zhou Q., Liu J., Yuan Y., Gui S., Sang X., Sun Q., Hong J., Yu X., Wang L., Li B. and Hong F. (2014a) - Neurotoxic characteristics of spatial recognition damage of the hippocampus in mice following subchronic peroral exposure to TiO₂ nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, **264**, 219-229.

Ze Y., Hu R., Wang X., Sang X., Ze X., Li B., Su J., Wang Y., Guan N., Zhao X., Gui S., Zhu L., Cheng Z., Cheng J., Sheng L., Sun Q., Wang L. and Hong F. (2014b) - Neurotoxicity and gene-expressed profile in brain-injured mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **102**, 2, 470-478.

Ze Y., Sheng L., Zhao X., Hong J., Ze X., Yu X., Pan X., Lin A., Zhao Y., Zhang C., Zhou Q., Wang L. and Hong F. (2014c) - TiO₂ Nanoparticles Induced Hippocampal Neuroinflammation in Mice. *PLoS ONE*, **9**, 3, e92230.

Zhang L., Bai R., Li B., Ge C., Du J., Liu Y., Le Guyader L., Zhao Y., Wu Y., He S., Ma Y. and Chen C. (2011) - Rutile TiO₂ particles exert size and surface coating dependent retention and lesions on the murine brain. *Toxicology Letters*, **207**, 1, 73-81.



INERIS

*maîtriser le risque
pour un développement durable*

Institut national de l'environnement industriel et des risques

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

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

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