



RAPPORT D'ÉTUDE
DRC-17-165593-08406A

26/09/2017

**Proposition d'un repère toxicologique
préliminaire pour le dioxyde de cérium
nanométrique pour des expositions
environnementales par voie respiratoire
ou orale**

INERIS

maîtriser le risque |
pour un développement durable |

Proposition d'un repère toxicologique préliminaire pour le dioxyde de cérium 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 la Transition Ecologique et Solidaire

Liste des personnes ayant participé à l'étude :

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

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

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

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

TABLE DES MATIÈRES

RESUME	6
GLOSSAIRE	7
1. INTRODUCTION	8
2. PROPRIETES	8
3. TOXICOCINETIQUE	10
3.1 Absorption	10
3.2 Distribution	11
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 Autres voies	13
5. EFFETS POUR DES EXPOSITIONS REPETEES (SUB-AIGUËS, SUB-CHRONIQUES ET CHRONIQUES)	14
5.1 Effets systémiques généraux	14
5.1.1 Exposition sub-aiguë	14
5.1.2 Exposition sub-chronique et chronique.....	17
5.2 Effets génotoxiques et cancérogènes	19
5.2.1 Effets génotoxiques	19
5.2.1.1 Etude <i>in vivo</i>	20
5.2.1.2 Etude <i>in vitro</i>	22
5.2.2 Effets cancérogènes.....	22
5.3 Effets sur le développement ou la reproduction	23
6. ETABLISSEMENT D'UNE RELATION DOSE EFFET	23
6.1 Valeurs et méthode existantes	23
6.2 Proposition de l'INERIS.....	23
6.2.1 Effets à seuil	24
6.2.2 Effets sans seuil.....	26
7. CONCLUSION	27
8. BIBLIOGRAPHIE	28

RESUME

L'utilisation croissante du dioxyde de cérium sous forme nanométrique augmente les risques d'exposition des populations aussi bien professionnelles que via l'environnement. Les caractéristiques différentes de chaque forme de nanoparticule de CeO₂ 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, les effets des nanoparticules de CeO₂ restent encore peu étudiés. Plusieurs études ont montré que pour des expositions aiguës et subaiguës le principal effet décrit est une atteinte pulmonaire de type inflammatoire avec des effets cytotoxiques à l'origine de lésions histopathologiques généralement réversibles. Ces effets sont également retrouvés dans les premiers résultats de la seule étude disponible pour des expositions sub-chronique et chronique. Aucune donnée relative aux résultats de l'analyse anapathologique n'est encore publiée. Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence des altérations de biomarqueurs pour d'autres types d'effets, en particulier des effets neurologiques.

Pour les **effets à seuil de dose**, la valeur préliminaire proposée est **20 ng.m⁻³**. Il s'agira de revoir cette valeur lors de la publication de l'ensemble des résultats de l'étude.

Cette valeur est développée à partir de l'étude de Keller (2015) en retenant comme effet critique une augmentation du nombre de neutrophiles et une cytotoxicité pulmonaire. La dose critique est une NOAEC de 0,1 mg.m⁻³. Un facteur d'incertitude de 900 est appliqué.

Pour les expositions par voie orale, seules deux études qui ont évalué le potentiel génotoxique des nanoparticules de CeO₂ sont disponibles, ce qui **ne permet pas la proposition d'une valeur pour cette voie d'exposition**.

GLOSSAIRE

ALAT	: Alanine Amino Transférase
ASAT	: Aspartate Amino Transférase
BET	: surface spécifique de Brunauer-Emmett-Teller
BMC	: Benchmark Concentration
BMCL10	: Limite à 10 % de la BMC
BPL	: Bonnes Pratiques de Laboratoire
CeO ₂	: dioxyde de cérium
EFSA	: European Food Safety Authority
Gamma-GT	: Gamma-Glutamyl Tranférase
GSH	: glutathion SH (réduit)
LDH	: Lactate déhydrogénase
JEFCA	: Joint Expert Group on Food Additives
LOAEC	: Lowest observable adverse effect concentration
LOAEL	: Lowest observable adverse effect level
MMAD	: diamètre aérodynamique moyen
nanoCeO ₂	: particules de dioxyde de cérium nanométriques
NOAEC	: No observable adverse effect concentration
NOAEL	: No observable adverse effect level
OCDE	: Organisation de Coopération et de Développement Économiques
RDDR	: Regional Deposited Dose Ratio (ratio de dose déposée localement)
RfC	: Reference concentration (concentration de référence)
TiO ₂	: dioxyde de titane
VME	: Valeur Moyenne d'Exposition
VTR	: Valeur Toxicologique de Référence

1. INTRODUCTION

Le dioxyde de cérium sous forme nanométrique (nanoCeO_2) est de plus en plus utilisé dans diverses applications du fait de ses propriétés spécifiques. Cette utilisation croissante augmente le risque d'exposition des populations aussi bien professionnelle que générale. Compte tenu de ce contexte, le ministère en charge de l'environnement a chargé l'INERIS de réaliser une étude bibliographique en vue de proposer une valeur repère en toxicologie pour ce composé. Il s'agit d'une valeur préliminaire qui ne doit pas être confondue avec une valeur toxicologique de référence (VTR).

La première étape de ce travail a donc été la réalisation d'une recherche bibliographique (INERIS, 2017) afin d'identifier les données disponibles relatives aux effets sur la santé de l'exposition au nanoCeO_2 . Elle a été réalisée avec les mots clé : « ceria AND toxicology », « ceria nanoparticles AND toxicology » et « ceria oxide nanoparticles AND toxicology » sur les bases de données PubMed et ScienceDirect et a permis de sélectionner 27 études correspondant à 46 expérimentations différentes (INERIS, 2017). Ce travail a été réalisé en s'appuyant également sur plusieurs documents de synthèse (Afssaps, 2011 ; ECHA, 2015 ; EFSA, 2016 ; HEI, 2001 ; IARC, 2010 ; INRS, 2013, 2016b ; JRC, 2014 ; NanoCare, 2009 ; OCDE, 2015 ; US-EPA, 2009).

Une analyse de ces données a permis de sélectionner les informations utiles pour la proposition d'une relation dose-effet (INERIS, 2017). Elle a cependant 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. Bien qu'il existe des limites, il a été jugé opportun de poursuivre la démarche compte tenu du contexte général concernant les éventuels impacts sanitaires liés à cette substance. Ces limites devront être gardées à l'esprit lors de l'utilisation de cette valeur.

Le présent rapport propose une synthèse générale des données et une description plus détaillée des études clés qui ont été jugées les plus pertinentes pour l'élaboration d'une relation dose/effet. Enfin, les informations rapportées concernent essentiellement les particules de CeO_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 CeO_2 .

2. PROPRIETES

Le cérium est une terre rare (la plus abondante dans la croûte terrestre) de la série des lanthanides. Le cérium est présent dans la nature comme pour les autres lanthanides au sein de minéraux tels que : l'alanite, la bastanite, la monazite, la cerite et la samarskite (US-EPA, 2009). Le cérium peut exister sous deux états de valence qui sont le cérium trivalent (Ce^{3+}) et le cérium tétravalent (Ce^{4+}) ; ce dernier étant une forme très stable. Ces deux états de valence se retrouvent au sein des nanoparticules de CeO_2 selon des proportions très variables dépendantes de la nanoparticule et du milieu dans lequel elle se trouve.

Le dioxyde de cérium (formule chimique CeO₂, N°CAS : 1306-38-3) est généré par oxydation lors de la séparation du cérium des autres terres rares. C'est un composé non soluble dans l'eau utilisé dans différents domaines comme par exemple l'émaillage, la production d'optique de précision, en tant que catalyseur pour améliorer la combustion des essences diesel notamment pour ses propriétés antioxydantes.

Le dioxyde de cérium ultrafin ou nanométrique est composé principalement de particules primaires de taille < 100 nm dont le diamètre est généralement compris entre 5 et 90 nm¹ avec une surface spécifique BET² variant de 10 à 120 m².g⁻¹ (soit une surface spécifique volumique équivalente³ d'environ 70 – 870m².cm⁻³ pour une densité de 7,22 g.cm⁻³ (Kim *et al.*, 2014)).

La nature de la composition chimique de surface, ou l'enrobage, des nanoparticules peut varier d'une nanoparticule à l'autre en fonction de leur mode de production, modifiant ainsi les capacités de réaction de la nanoparticule. Ainsi, différents composés peuvent être ajoutés comme le titane, le lithium, le potassium ou l'aluminium entraînant une modification des propriétés physico-chimiques du dioxyde de cérium (NanoCare, 2009).

Les nanoparticules se trouvent rarement sous forme individuelle dans le milieu de manière générale : 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...) (INRS, 2016a).

Cette substance fait partie des matières particulaires nanométriques faiblement solubles dans l'eau (JRC, 2014), au même titre que le TiO₂. Cette faible solubilité entraîne une forte biopersistance pulmonaire qui est dépendante de la durée et de la concentration de l'exposition (Pauluhn, 2011).

Dans le cadre du programme sponsor de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) pour l'évaluation des nanoparticules, la caractérisation de plusieurs particules de dioxyde de cérium a été précisée (OCDE, 2015). Les particules qui ont été utilisées dans plusieurs études reprises dans le présent rapport sont décrites dans le Tableau 1 en suivant les critères proposés par Hartmann (Hartmann *et al.*, 2017).

¹ Données issues des caractérisations des différentes nanoparticules recensées (INERIS, 2017).

² La surface spécifique de Brunauer-Emmett-Teller

³ Calculé selon la formule : surface spécifique volumique équivalente = surface spécifique x densité

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques des nanoparticules de CeO₂ NM-211 et NM-212 (d'après OECD.,2015 et Hartmann et al., 2017)

Paramètres mesurés	Nanoparticules	
	NM-211	NM-212
Numéro CAS	1306-38-3	
Taille selon le fabricant	4 – 15 nm	40 nm
Apparence/état physique/couleur	Particules de taille similaire (agrégés/agglomérées). Quasiment sphérique avec une morphologie régulière.	Grande variation de taille mais moins agglomérées que NM-211. Forme polyhédrique avec une morphologie irrégulière
Distribution de la taille des particules (issue des mesures par différentes méthodes)	7 – 15 nm	8 – 57 nm
Diamètre géométrique moyen (déviatoin standard)	225 nm (1,77)	359 nm (1,66)
Aire de surface spécifique (BET)	65,9 ± 2,2 m ² .g ⁻¹	27,2 ± 0,9 m ² .g ⁻¹
Pureté (%)	> 99,5	> 99,5
Ce ⁴⁺ (%)/Ce ³⁺ (%)	94,3/5,7	93,1/6,9
Potentiel zeta (mV) dans l'eau distillée (selon pH) <ul style="list-style-type: none"> • 6,20 • 8,10 	<ul style="list-style-type: none"> • -17,35 • -33,1 	<ul style="list-style-type: none"> • -27,86 • -29,63
Solubilité dans l'eau (JRC, 2014)	Insoluble	
Densité (g.cm ⁻³) (Kim et al., 2014)	7,22	
Potentiel redox (Eau distillée)	414 mV	416 mV
Enrobage	Aucun	

3. TOXICOCINETIQUE

Les données disponibles sont essentiellement issues d'études expérimentales de toxicocinétique (Geraets *et al.*, 2012 ; Hirst *et al.*, 2013 ; Molina *et al.*, 2014 ; Xiao *et al.*, 2010) et d'études de toxicologie dans lesquelles une évaluation de la biodistribution a été effectuée (Aalapati *et al.*, 2014 ; Kumari *et al.*, 2014b ; Kumari *et al.*, 2014a ; Yokel *et al.*, 2014).

3.1 ABSORPTION

De manière générale, l'absorption des nanoparticules pour les différentes voies d'exposition (respiratoire, digestive et cutanée) est dépendante de leur composition et de leur potentiel à former des agglomérats (Oberdorster *et al.*, 2005)

Pour les nanoCeO₂, aucune étude n'a quantifié l'absorption précisément cependant sur la base des données de distribution les auteurs considèrent que l'absorption par voie orale ou pulmonaire est très limitée (Yokel *et al.*, 2014 ; Molina *et al.*, 2014 ; Geraets *et al.*, 2012). En effet, dans une étude évaluant la biodistribution du nanoCeO₂ après exposition par inhalation (Geraets *et al.*, 2012), la quantité retrouvée dans les tissus extra-pulmonaires était inférieure à 0,2 % de la dose inhalée dans l'heure suivant la dernière exposition même si l'absorption semble favorisée pour les nanoparticules ayant une taille voisine à 40 nm (Geraets *et al.*, 2012 ; Loret, 2017).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données concernant les expositions par voie cutanée, cependant, en l'absence de détérioration de la barrière cutanée et/ou de solvant organique il est peu probable d'assister à la pénétration du dioxyde de cérium dans l'organisme (Yokel et MacPhail, 2011).

3.2 DISTRIBUTION

Même si les nanoCeO₂ sont peu absorbées, celles qui sont absorbées se distribuent dans tout l'organisme.

Suite à une exposition orale, il a été montré que les faibles quantités de nanoCeO₂ qui ont été absorbées se distribuent dans de nombreux organes tels que le foie, les reins, le système nerveux central, la rate, le cœur et le sang (Kumari *et al.*, 2014a ; Kumari *et al.*, 2014b).

Par inhalation, la demi-vie pulmonaire dépend de la concentration d'exposition : les nanoparticules peuvent induire une saturation des phénomènes de clairance pulmonaire et ainsi conduire une augmentation de la demi-vie pulmonaire des nanoparticules de dioxyde de cérium (Pauluhn, 2011). Pour des expositions par inhalation ou injection intratrachéales, seule la fraction absorbée des nanoCeO₂ se distribue dans les ganglions lymphatiques, le foie, la rate, les reins et le système nerveux central (Geraets *et al.*, 2012 ; Molina *et al.*, 2014 ; Xiao *et al.*, 2010 ; Yokel *et al.*, 2014).

3.3 METABOLISME

Il n'existe pas d'informations disponibles concernant le métabolisme de ces particules (OCDE, 2015).

3.4 ÉLIMINATION

. Après exposition par voie orale ou par inhalation, les nanoparticules sont majoritairement excrétées par les fèces et de manière moindre par voie urinaire (Hirst *et al.*, 2013 ; Kumari *et al.*, 2014a ; Molina *et al.*, 2014 ; US-EPA, 2009).

4. EFFETS AIGUS

Les données disponibles sont essentiellement des études chez le rat et la souris.

4.1 VOIE RESPIRATOIRE

4.1.1 INHALATION

Cinq études ont évalué les effets d'une exposition aiguë par inhalation (Aalapati *et al.*, 2014 ; Demokritou *et al.*, 2013 ; Keller *et al.*, 2014 ; OCDE, 2015 ; Srinivas *et al.*, 2011). Ces études correspondent à des expositions à des nanoparticules de CeO₂ différentes mais elles rapportent toutes des réactions de type inflammatoire, caractérisée notamment par une infiltration cellulaire de neutrophiles et de lymphocytes et une formation d'un amas inflammatoire autour des macrophages et des nanoparticules et une cytotoxicité plus ou moins marquées. Ces effets sont

observés pour des expositions à 2 mg.m^{-3} de nanoCeO₂ (45 nm) 6 h/j, pendant 7 jours (Aalapati *et al.*, 2014), dès $0,5 \text{ mg.m}^{-3}$ de nanoCeO₂ NM-212 6 h/j, pendant 5 jours (Keller *et al.*, 2014), ou dès $0,5 \text{ mg.m}^{-3}$ de nanoCeO₂ 70 nm 6 h/j, pendant 5 jours. Ces effets observés pour une exposition à $2,7 \text{ mg.m}^{-3}$ avec une nanoCeO₂ 90 nm de 2 h/j, pendant 4 j ne sont pas retrouvés pour les conditions expérimentales avec une nanoCeO₂ 100 nm enrobée de SiO₂ (Demokritou *et al.*, 2013)

4.1.2 INSTILLATION INTRA-TRACHEALE

Plusieurs études ont évalué les effets d'une exposition aiguë par instillation intratrachéale (Cho *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2011 ; Ma *et al.*, 2012 ; Ma *et al.*, 2014 ; Ma *et al.*, 2015 ; Morimoto *et al.*, 2015 ; OCDE, 2015 ; Park *et al.*, 2010 ; Peng *et al.*, 2014 ; Rice *et al.*, 2015). Comme pour les expositions par inhalation et malgré la variété des nanoparticules utilisées, ces études montrent également des effets pulmonaires caractérisés par une réaction inflammatoire, cytotoxiques.

Ces effets sont observés dès une instillation intra trachéale de $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Ma *et al.*, 2011), $0,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Morimoto *et al.*, 2015). Ces effets peuvent être accompagnés par un début de fibrose pulmonaire un à 3 mois après une exposition unique respectivement pour des concentrations de $3,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ et 1 mg.kg^{-1} (Ma *et al.*, 2012).

Une étude menée chez le rat Sprague-Dawley montre la survenue d'effets hépatiques caractérisés par une diminution du poids du foie et par des altérations histopathologiques, telles qu'une dégénérescence œdémateuse dose-dépendante, une hépatocytomégalie et une dilatation sinusoidale après administration d'une dose unique une suspension de nanoCeO₂ (1 ; 3,5 et 7 mg.kg^{-1}) d'un diamètre primaire mesuré de $10,14 \pm 0,76 \text{ nm}$ par voie intratrachéale (Nalabotu *et al.*, 2011). Ces effets sont associés à une modification des biomarqueurs sériques comprenant une augmentation des niveaux d'alanine amino transférase (ALAT), une diminution des niveaux d'albumine et du ratio sodium/potassium et une diminution du niveau des triglycérides. Dans cette étude, aucune altération histopathologique n'est observée dans les reins, le cœur et la rate.

Une seule administration d'une suspension de nanoCeO₂ ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) d'un diamètre moyen de 20 nm à des souris BALB/C induit une augmentation de biomarqueurs de l'inflammation et/ou du stress dans les poumons, le cœur, le foie, les reins, la rate et le système nerveux central (Nemmar *et al.*, 2017).

4.2 VOIE ORALE

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude concernant la toxicité aiguë par voie orale des nanoparticules de dioxyde de cérium.

4.3 VOIE CUTANEE

Une étude effectuée sur un modèle de peau reconstituée (Epiderm™) montre que l'exposition au nanoCeO₂ (particules de taille primaire 9 nm) n'induit pas de perte de viabilité cellulaire importante (< 50%). Cela indique que le nanoCeO₂ ne semble pas avoir de potentiel irritant pour la peau *in vivo* (Park *et al.*, 2007).

Cependant, ce point nécessite des investigations supplémentaires, un test négatif ne suffisant pas pour déterminer le potentiel irritant d'une substance.

4.4 AUTRES VOIES

Cinq études ont été menées voie intra veineuse (IV) chez le rat. Les résultats obtenus avec cette voie d'administration qui n'est pas physiologique ne peuvent pas être directement utilisés pour proposer une valeur repère. Cependant, ils apportent des informations complémentaires quant aux effets potentiels du nano CeO₂ et qui pourraient être retrouvés lors d'exposition par des voies d'exposition physiologiques s'ils étaient recherchés.

Ces études rapportent des effets de type hépatique (Tseng *et al.*, 2012 ; Tseng *et al.*, 2014) et neurologique (Hardas *et al.*, 2012 ; Hardas *et al.*, 2014 ; Yokel *et al.*, 2009).

Concernant les effets hépatiques, deux nanoparticules différentes de CeO₂ de taille de 5 et 30 nm ont été étudiées. Dans les deux cas, des effets hépatiques de type inflammatoire avec formation de granulomes et stress oxydant avec une augmentation des niveaux d'aspartate aminotransférase (ASAT) dans les heures suivant l'administration et l'induction d'apoptose au niveau hépatique ont été observés. L'ensemble de ces données, en plus de l'accumulation des nanoparticules de dioxyde de cérium au niveau hépatique après leur passage au niveau systémique, semble montrer un possible effet hépatique de ces nanoparticules.

Les trois études relatives à de potentiels effets neurologiques ne suivent pas des protocoles standardisés qui pourraient permettre de détecter un effet neurotoxique cependant elles apportent des informations utiles quant à un éventuel effet du nanoCeO₂ sur le système nerveux central. L'étude de Yokel (2009) a mis en évidence la possible distribution des nanoparticules vers le cerveau. Les deux études de Hardas rapportent l'induction de biomarqueurs de stress oxydant notamment au niveau de l'hippocampe ce qui témoigne d'un effet potentiel de particules de taille de 5 à 30 nm. L'hippocampe est une structure cérébrale impliquée dans les maladies neurodégénératives telle qu'Alzheimer ainsi que dans les mécanismes de mémorisation et d'apprentissage.

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

5.1 EFFETS SYSTEMIQUES GENERAUX

A notre connaissance il n'existe pas de données pour des expositions par voie orale.

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

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

5.1.1 EXPOSITION SUB-AIGUË

Quatre études rapportent les effets d'une exposition sub-aiguë par inhalation (Aalapati *et al.*, 2014 ; Gosens *et al.*, 2014 ; Keller *et al.*, 2014 ; Morimoto *et al.*, 2015).

- **Aalapati *et al.*, 2014**

Des souris CD-1 mâles ont été exposées en « nose only » à 2 mg.m⁻³, 6 h/j, pendant 14 ou 28 jours, de plus, deux groupes supplémentaires ont été ajoutés au groupe exposé 28 jours pour étudier la réversibilité des effets 14 ou 28 jours après la fin de l'exposition. La caractérisation de la particule de structure cubique a été réalisée : 45 nm, un diamètre aérodynamique moyen de 1,4 µm (écart type géométrique : 2,4) et un diamètre hydrodynamique de 344 nm.

Dès 14 jours d'exposition à 2 mg.m⁻³, des effets pulmonaires sont observés avec notamment une inflammation pulmonaire objectivée par une augmentation statistiquement significative des neutrophiles, des lymphocytes et des cytokines pro-inflammatoires. Les niveaux de certaines cytokines diminuent mais restent cependant élevés 28 jours après l'exposition (TNF-α, IL-1β et IL-6). La manifestation d'un stress oxydant (augmentation malondialdéhyde et diminution de la forme réduite du glutathion-SH, GSH) à 28 jours ainsi qu'une cytotoxicité réversible (augmentation de la lactate déshydrogénase, LDH) après 28 jours ont été également observés. A 14 jours, une fibrose modérée à marquée avec présence de granulomes multifocaux associée à des réactions inflammatoires chroniques sévères est rapportée. A 28 jours, tous les animaux présentent des granulomes multiples associés à de la fibrose. Quelle que soit la durée d'exposition, une protéinose alvéolaire sévère et la présence de neutrophiles et de macrophages alvéolaires chargés en particules sont observées.

Des effets hépatiques, rénaux et cardiaques sont également observés comprenant une hépatomégalie, une nécrose au niveau rénal et des vacuolisations cytoplasmiques cardiaques. Ces effets pulmonaires, rénaux, hépatiques et cardiaques semblent ne sont pas réversibles 28 jours après la fin de l'exposition.

Une **LOAEC de 2 mg.m⁻³** est retenue pour une réaction inflammatoire pulmonaire.

- **Gosens et al., 2014**

Des rats Wistar mâles et femelles ont été exposés « nose only » à un aérosol de 50 mg.m⁻³ de nanoparticules (NM-211 ou NM-212) ou une microparticule (NM-213)⁴ de dioxyde de cérium 40 min, 2 h ou 6 h/j, 5 j/sem pendant 28 jours.

Les effets sont assez similaires pour les trois particules : il n'a pas été observé d'inflammation systémique ni d'altération hématologique, les principaux effets sont observés au niveau pulmonaire. Pour les trois types de particules, une réaction de type inflammatoire au niveau pulmonaire est rapportée avec une augmentation statistiquement significative des neutrophiles (effet le plus précoce) ainsi que des lymphocytes pulmonaires et une cytotoxicité (augmentation LDH et protéines totales).

Les effets inflammatoires persistent 28 jours après la fin de l'exposition, mais semblent cependant moins importants.

Dans cette étude, des benchmark concentrations (BMC) ont été calculées pour ces différentes particules. Il a été montré que selon le critère de mesure retenu (concentration massique, nombre de particules ou concentration de surface) l'analyse comparée l'ordre des niveaux de danger des trois particules n'est pas le même ce qui ne permet pas de conclure quant au choix de la métrique la plus pertinente mais souligne l'existence de ces variations.

En utilisant la métrique habituelle pour les substances non-nanométriques, **les LOAEC** retenues pour les différentes substances sont : **1,2 mg.m⁻³, 2,5 mg.m⁻³ et 5,9 mg.m⁻³** respectivement pour **NM-211, NM-212 et NM-213**.

- **Morimoto et al., 2015**

Des rats Fischer 344 mâles ont été exposés corps entier à 2 ou 10 mg.m⁻³, 6 h/j, 5 j/sem pendant 28 jours à du nanoCeO₂. Une analyse du liquide bronchoalvéolaire a été pratiquée à 3 j, 1 et 3 mois après la fin de l'exposition. Une caractérisation des particules initiales selon la concentration et une évaluation de la concentration des aérosols utilisés a été réalisée :

- 2,09 ± 0,29 mg.m⁻³ (faible concentration) diamètre primaire de 7,8 nm avec un diamètre géométrique moyen de 87,6 ± 7,9 nm

- 10,2 ± 1,38 mg.m⁻³ (forte concentration) diamètre primaire de 7,8 nm, avec un diamètre géométrique moyen de 110 ± 12,5 nm.

Dès 2 mg.m⁻³, une augmentation dose-dépendante du nombre total de cellules recueillies dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire correspondant à une augmentation statistiquement significative du nombre et du pourcentage de neutrophiles et du nombre de lymphocytes et de macrophages est mesurée à 3 jours. Une cytotoxicité accompagnée d'une augmentation persistante de la LDH mais diminuant avec le temps est également rapportée. L'inflammation est également démontrée via l'augmentation de deux cytokines qui sont CINC-1 et CINC-2 (diminuant avec le temps) et d'une enzyme l'hème oxygénase (HO-1). Au niveau histopathologique, une infiltration macrophagique et lymphocytaire avec rétention des particules de CeO₂ dans les macrophages alvéolaires est observée. De plus, après une période de réversibilité de 3 mois, l'inflammation pulmonaire est persistante avec un afflux de neutrophiles.

⁴ NM-213 : taille < 5 000 nm et diamètres aérodynamiques moyen 1,40 ± 0,11 µm

Dans cette étude, seule une **LOAEC : 2 mg.m⁻³** a pu être déterminé pour une inflammation pulmonaire.

- **Keller et al., 2014 ; Keller, 2015**

Cette étude a donné lieu à une publication en 2014, les résultats complémentaires d'anapathologie n'ont pas été publiés dans une revue mais sont disponibles dans la thèse du même auteur. Des rats Wistar femelles ont été exposés corps entier à 0,5 – 5 – 25 mg.m⁻³, 6 h/j, 5 j/sem pendant 4 semaines à des particules ultrafines de CeO₂ (NM-212). Les animaux ont été suivis pendant 129 jours après la fin de l'exposition. Des lavages bronchoalvéolaires et des examens histopathologiques ont été réalisés à différents moments.

A 0,5 mg.m⁻³, le seul effet observé au niveau pulmonaire à l'issue de l'exposition est une augmentation des protéines totales dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire.

A 5 mg.m⁻³ et à 25 mg.m⁻³, des effets de type inflammatoire au niveau pulmonaire sont observés, notamment une augmentation significative des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes avec une augmentation significative de certains médiateurs cellulaires. Certains de ces paramètres sont encore augmentés 35 jours après la fin de l'exposition (neutrophiles, lymphocytes, LDH, gamma-glutamyl transférase (gamma-GT), phosphatase alcaline, MCP-1 et CINC-1). De plus, la formation de granulome pulmonaire avec une hyperplasie des ganglions médiastinaux et trachéo-bronchiques est rapportée. Une augmentation de la prolifération cellulaire est observée à 25 mg.m⁻³ dans tous les compartiments (bronches larges et moyennes, bronchioles terminales et alvéoles) deux jours après la fin de l'exposition et à toutes les concentrations 4 semaines après la fin de l'exposition.

Les effets de type inflammatoire ainsi que les effets observés au niveau histopathologique persistent 35 jours après la fin de l'exposition.

Dans cette étude une **NOAEC : 0,5 mg.m⁻³** et une **LOAEC : 5 mg.m⁻³** ont pu être déterminées pour une réaction inflammatoire pulmonaire.

Tableau 2 : Synthèse des différentes études d'exposition subaiguë par inhalation

Espèce, sexe et conditions d'exposition	Concentrations testées au cours de l'étude	Description des particules	Concentrations critiques et effets associés	Référence
Souris M CD-1 6 h/j pendant 7, 14 ou 28 jours	2,0 ± 0.035 mg.m ⁻³	15 – 30 nm Diamètre aérodynamique moyen (agglomérats) de 1,4 (2,4 µm)	Pas de NOAEC LOAEC : 2 mg.m ⁻³ Réaction inflammatoire pulmonaire	<u>Aalapati et al. (2014)</u>
Rats M et F Wistar 40 min – 2h ou 6h/j, 5 j/sem pendant 28 jours	Aérosol à 50 mg.m ⁻³ 1,2 – 3,5 – 10,8 mg.m ⁻³	NM-211 5 – 10 nm Diamètre aérodynamique moyen (agglomérats) de 1,02 ± 0,04 µm	Pas de NOAEC LOAEC : 1,2 mg.m ⁻³ Réaction inflammatoire pulmonaire	<u>Gosens et al. (2014)</u>
Rats M et F Wistar 40 min – 2 h ou 6 h/j, 5 j/sem pendant 28 jours	Aérosol à 50 mg.m ⁻³ 2,5 – 6,7 – 19,9 mg.m ⁻³	NM-212 40 nm Diamètre aérodynamique moyen (agglomérats) de 1,17 ± 0,34 µm	Pas de NOAEC LOAEC : 2,5 mg.m ⁻³ Réaction inflammatoire pulmonaire	<u>Gosens et al. (2014)</u>
Rats M Fischer 344 6 h/j, 5 j/sem pendant 28 jours	2 – 10 mg.m ⁻³ Mesurées à : 2,09 ± 0,29 et 10,2 ± 1,38	Particules ultrafines de CeO₂ 7,8 nm Agrégats présents avec un diamètre aérodynamique moyen de 110 ± 12,5 nm (10 mg.m⁻³) et 87,6 ± 7,9 nm (2 mg.m⁻³)	Pas de NOAEC LOAEC : 2 mg.m ⁻³ Réaction inflammatoire pulmonaire	Morimoto et al. (2015)
Rats F Wistar 6 h/j, 5 j/sem pendant 28 jours	0,5 – 5 – 25 mg.m ⁻³	NM-212 40 nm Diamètre aérodynamique moyen (agglomérats) : 0,9 ; 1,9 et 2,2 µm respectivement pour 0,5 ; 5 et 25 mg/m ³	NOAEC : 0,5 mg.m ⁻³ LOAEC : 5 mg.m ⁻³ Réaction inflammatoire pulmonaire	<u>Keller et al. (2014)</u> <u>Keller et al. (2015)</u>

La plupart de ces études rapportent des effets pulmonaires de type inflammatoire qui semblent ne pas être réversibles jusqu'à 3 mois après la fin de l'exposition (Morimoto *et al.*, 2015) ce qui témoigne d'une chronicité de ces effets.

5.1.2 EXPOSITION SUB-CHRONIQUE ET CHRONIQUE

Une seule étude est disponible. Elle a été réalisée en suivant la ligne directrice OCDE n°453 et les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Elle rapporte les effets d'une exposition sub-chronique et chronique par inhalation. Seuls des résultats préliminaires présentés dans un travail de thèse concernant les effets pulmonaires (analyse du liquide de lavage broncho-alvéolaire) à 13 et à 52 semaines sont disponibles (Keller, 2015) et dans le projet Européen Nanoreg 2 en ce qui concerne les premiers éléments de l'analyse histopathologique (Nanoreg, 2017).

- **(Keller, 2015 ; Nanoreg, 2017)**

Des rats Wistar femelles ont été exposés corps entier à 0,1 – 0,3 – 1 – 3 mg.m⁻³, 6 h/j, 5 j/sem pendant 13 ou 52 semaines au nanoCeO₂ (NM-212). La taille des particules initiales est de 40 nm avec des diamètres aérodynamiques de 2,3 – 1,7 – 1,5 - 1,4 µm respectivement pour les concentrations de 0,1 – 0,3 – 1 et 3 mg.m⁻³. A l'issue de l'exposition, des lavages bronchoalvéolaires et des prélèvements trachéobronchiques et des ganglions lymphatiques du médiastin ont été réalisés pour mesurer la charge pulmonaire à partir de 5 rats.

Exposition pendant 13 semaines

A 0,1 mg.m⁻³ et 0,3 mg.m⁻³, l'augmentation de la quantité totale de cellules et du nombre de macrophages dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire mesurée est statistiquement significative.

A partir de 1 mg.m⁻³, une augmentation dose-dépendante du nombre de neutrophiles et de lymphocytes est observée en l'absence d'augmentation du nombre des macrophages. A partir de cette concentration, ces effets sont associés à une augmentation de la LDH (cytotoxicité), de la gamma-GT et des phosphatases alcalines.

A 3 mg.m⁻³, une augmentation statistiquement significative des monocytes est également rapportée ainsi que des protéines totales et de la N-acétylglucosaminidase (marqueurs de l'inflammation).

Pour une exposition de 13 semaines, une NOAEC de 0,3 mg.m⁻³ et une LOAEC de 1 mg.m⁻³ sont proposées par l'auteur pour une réaction inflammatoire pulmonaire.

En effet, il apparait que les effets observés à 0,1 et 0,3 mg.m⁻³ (augmentation de la quantité totale de cellules et de macrophages dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire) peuvent être considérés comme une adaptation physiologique liés aux phénomènes de clairance pulmonaire.

Exposition pendant 1 an

A partir de 0,1 mg.m⁻³ : une augmentation statistiquement significative des gamma-GT est observée dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire sans augmentation d'autres biomarqueurs.

A partir de 0,3 mg.m⁻³, une augmentation statistiquement significative des neutrophiles et des lymphocytes est mesurée. Ces effets sont plus marqués que pour une exposition de 13 semaines.

A 1 et 3 mg.m⁻³, une augmentation statistiquement significative de la LDH (cytotoxicité) et des cytokines CINC-1 et MCP-1 est rapportée. L'effet sur les cytokines est cependant moins marqué que lors d'une exposition plus courte de 13 semaines.

A 3 mg.m⁻³, une augmentation de la quantité totale des cellules du liquide de lavage broncho-alvéolaire est observée.

Analyse histopathologique

Les résultats préliminaires de l'analyse histopathologique sont disponibles pour un nombre restreint d'animaux après un an d'exposition. Cette analyse a montré la déposition de nanoparticules dans les macrophages au niveau alvéolaire et sous épithélial et différentes altérations histologiques en lien avec le phénomène d'inflammation. Ces altérations correspondent à une infiltration pulmonaire de cellules inflammatoires augmentée de manière statistiquement significative dès $0,3 \text{ mg.m}^{-3}$ et une hyperplasie, une fibrose et des granulomes qui surviennent de manière dose-dépendante et sont augmentées de manière statistiquement significative à partir de 1 mg.m^{-3} . Aucune lésion néoplasique ou pré-néoplasique n'a été rapportée.

Pour une exposition d'un an, une **NOAEC : $0,1 \text{ mg.m}^{-3}$** et une **LOAEC : $0,3 \text{ mg.m}^{-3}$** ont été déterminées par l'auteur pour une réaction inflammatoire. L'effet observé à $0,1 \text{ mg.m}^{-3}$ n'est pas considéré comme néfaste du fait de l'absence d'autre altération au niveau du liquide de lavage broncho-alvéolaire.

Evaluation de l'étude : le protocole suit les recommandations des lignes directrices (OCDE n°453) et les principes des BPL. La particule est bien détaillée et bien décrite dans le cadre du programme sponsor de l'OCDE (NM-212) pour l'évaluation des nanoparticules. Les résultats préliminaires de cette étude sont cohérents avec les résultats des études d'exposition aiguë et subaiguë. Cette étude est de bonne qualité (cotation 1 selon Klimisch (Klimisch *et al.*, 1997)).

Tableau 3 : Synthèse des études d'exposition sub-chronique et chronique par inhalation

Espèce, sexe et conditions d'exposition	Concentrations testées au cours de l'étude	Description des particules	Concentrations critiques et effets associés	Référence
Rats femelles Wistar 6 h/j, 5 j/sem pendant 13 semaines	$0,1 \pm 0,1 - 0,3 \pm 0,1 - 1 \pm 0,1$ et $3 \pm 0,4 \text{ mg.m}^{-3}$	NM-212 40 nm	NOAEC : $0,3 \text{ mg.m}^{-3}$ LOAEC : 1 mg.m^{-3} Pour une réaction inflammatoire pulmonaire	Keller. (2015)
Rats femelles Wistar 6 h/j, 5 j/sem pendant 52 semaines			NOAEC : $0,1 \text{ mg.m}^{-3}$ LOAEC : $0,3 \text{ mg.m}^{-3}$ Pour une réaction inflammatoire pulmonaire	

5.2 EFFETS GENOTOXIQUES ET CANCEROGENES

5.2.1 EFFETS GENOTOXIQUES

Seules les principales études pour des expositions *in vivo* ou *in vitro* sont présentées ici.

5.2.1.1 ETUDE *IN VIVO*

Trois études d'exposition *in vivo* ont évalué le potentiel génotoxique des nanoCeO₂ : deux par voie orale pour des expositions aiguës (Kumari *et al.*, 2014b) et sub-aiguës (Kumari *et al.*, 2014a) et une par inhalation (Cordelli *et al.*, 2017).

- **(Kumari *et al.*, 2014b)**

Des rats albinos Wistar femelles ont été exposés par voie orale (administration unique) à 100 – 500 – 1 000 mg.kg⁻¹ pc soit à des particules ultrafines de nanoCeO₂ (< 25 nm) soit à des particules fines (micrométriques, < 5 µm) de CeO₂. Trois tests différents ont été réalisés : un test du micronoyau, un test des comètes et un test d'aberrations chromosomiques. Le test des comètes *in vivo* a été réalisé sur les leucocytes du sang périphérique et sur le foie à 4, 24, 48 et 72 heures après l'exposition, le test du micronoyau a été réalisé sur la moelle osseuse à 24 et 48 h après l'exposition ainsi que sur le sang total à 48 et 72h après l'exposition. Le test d'aberrations chromosomiques sur les cellules de la moelle osseuse a été effectué 18 et 24 h après l'exposition. Des mesures des paramètres biochimiques (phosphatases alcalines, LDH et GSH) ont également été réalisées 24 et 48 h après l'exposition.

Le test des comètes a mis en évidence une augmentation statistiquement significative des dommages à l'ADN dans les leucocytes du sang périphérique et dans les cellules du foie à 24 et 48 h après l'exposition à 1 000 mg/kg de nanoCeO₂ sans diminution de la viabilité cellulaire. Il est également rapporté une augmentation statistiquement significative des micro-noyaux après exposition à 1 000 mg.kg⁻¹ de nanoCeO₂ dans les cellules de la moelle osseuse (24 et 48 h après l'exposition) et dans les cellules du sang périphérique (48h après l'exposition). De plus, il a également été observé, une augmentation des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse 18 et 24 h après l'exposition à 1 000 mg.kg⁻¹ de nanoCeO₂.

Ces effets sont accompagnés d'altérations biochimiques à 24 et 72 h après l'exposition à 1 000 mg.kg⁻¹ de nanoCeO₂ avec notamment une augmentation statistiquement significative de deux biomarqueurs qui sont la LDH (cytotoxicité) et les phosphatases alcalines (stress oxydatif) et la diminution statistiquement significative du stock de glutathion dans le foie, les reins et le système nerveux.

- **(Kumari *et al.*, 2014a)**

Des rats albinos Wistar mâles et femelles ont été exposés par voie orale à 30 – 300 – 600 mg.kg⁻¹ pc pendant 28 jours à des particules ultrafines (< 25 nm) ou fines (micrométriques, < 5 µm) de CeO₂. Trois tests de génotoxicité ont été menés à l'issue des 28 jours d'exposition : un test des comètes sur les leucocytes du sang périphérique et le foie, un test des micronoyaux sur la moelle osseuse et le sang périphérique ainsi qu'un test d'aberration chromosomique sur la moelle osseuse. Pour chacun des tests, la cytotoxicité dans la population cellulaire a été vérifiée. Des mesures de paramètres biochimiques (phosphatases alcalines, LDH et GSH) ainsi qu'une évaluation du poids corporels, de l'alimentation et du poids des organes ont également été réalisées.

Cette étude montre des effets similaires à ceux observés pour des expositions aiguës (Kumari *et al.*, 2014b). Il s'agit dans le test des comètes d'une augmentation statistiquement significative des dommages à l'ADN dans les

leucocytes du sang périphérique et dans les cellules du foie aux concentrations de 300 et 600 mg.kg⁻¹ de poids corporels. Des augmentations statistiquement significatives des micronoyaux dans la moelle osseuse et le sang périphérique ainsi que des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse ont également été rapportées après 28 jours d'exposition à 300 et 600 mg.kg⁻¹ pc de nanoCeO₂. Ces effets sont observés en absence de cytotoxicité au sein de la population cellulaire étudiée.

Ces effets sont accompagnés d'altérations biochimiques notamment une augmentation statistiquement significative de deux biomarqueurs, la LDH (cytotoxicité) et les phosphatases alcalines (stress oxydatif), et une diminution statistiquement significative du stock de glutathion dans le foie, les reins et le système nerveux pour les concentrations de 300 et 600 mg.kg⁻¹ de nanoCeO₂. Ces effets sont indépendants du sexe et ne sont pas retrouvés après exposition à la forme micrométrique. De plus, il n'y a pas eu de variations de l'alimentation et du poids corporels des animaux durant l'étude ou du poids des organes à la fin de l'exposition.

Dans ces deux études (Kumari *et al.*, 2014a ; Kumari *et al.*, 2014b) l'analyse de la distribution de nanoCeO₂ a montré que les particules étaient retrouvées dans le foie, les reins, le système nerveux central, la rate, le cœur et le sang. Il est donc possible d'établir un lien entre la présence des nanoCeO₂ et les effets observés.

Ces résultats semblent indiquer que le nanoCeO₂ induit des effets génotoxiques. Cependant, ces effets observés en même temps que des altérations biochimiques liées à un stress oxydant et une cytotoxicité (augmentation de la LDH et des phosphatases alcalines et diminution du GSH) semble en faveur d'un lien entre le stress oxydant et la genèse d'effet génotoxique.

- **(Cordelli *et al.*, 2017)**

Cette étude a été menée en association avec l'étude de Keller (2015) décrite ci-dessus. Des rats Wistar femelles ont été exposés par inhalation corps entier à 0,1 – 0,3 – 1 – 3 mg.m⁻³, 6h/j, 5 j/sem pendant 3 et 6 mois à un type de particules ultrafines de CeO₂ (NM-212). Les altérations de l'ADN ont été recherchées dans les leucocytes du sang périphérique avec le test des comètes et les mutations géniques et les aberrations chromosomiques ont été mesurées sur les érythrocytes au moyen du test de mutation du gène Pig-a et du test du micronoyau. Il n'a pas été observé d'effet dans ces conditions expérimentales.

En synthèse des trois études ayant recherché des effets génotoxiques au cours d'exposition *in vivo*, les effets génotoxiques observés pour des expositions par voie orale à des niveaux élevés entraînant une augmentation significative de la cytotoxicité (LDH) et du stress oxydant (diminution de GSH et augmentation des phosphatases alcalines) (Kumari *et al.*, 2014a ; Kumari *et al.*, 2014b) ne sont pas retrouvés dans une étude d'exposition plus longue par inhalation à des concentrations faibles (Cordelli *et al.*, 2017). Même si ces éléments à eux seuls ne permettent pas de conclure, ils sont en faveur d'un effet probablement lié à un stress oxydant en lien avec les différents effets rapportés ci-dessus.

5.2.1.2 ETUDE *IN VITRO*

Deux études ont évalué le potentiel génotoxique des nanoCeO₂ *in vitro* (Benameur *et al.*, 2015 ; De Marzi *et al.*, 2013).

Un test des comètes a été conduit par exposition de trois lignées cellulaires humaines : cellules de carcinome hépatique (HepG₂), de carcinome du colon (CaCo₂) et de carcinome pulmonaire (A549) à des concentrations de 0,5 - 50 - 500 µg.mL⁻¹ de nanoCeO₂ (diamètre moyen compris entre 16 et 22 nm pendant 24h (De Marzi *et al.*, 2013)). Une augmentation statistiquement significative des dommages à l'ADN à 24 h a été mise en évidence à toutes les doses qui, selon l'auteur, serait due aux espèces réactives de l'oxygène générées par les nanoCeO₂.

Un test des micronoyaux a été effectué sur une culture primaire de fibroblastes humain exposée pendant 48h à une gamme de concentrations allant de 0,22 à 22 µM de nanoCeO₂, de diamètre moyen 7 nm, ou de microparticules de CeO₂, de diamètre moyen 322 nm (Benameur *et al.*, 2015). Une augmentation significative des micronoyaux avec des centromères non marqués par immunofluorescence (CENP-A) a été observée avec les nanoCeO₂ à toutes les doses ce qui témoigne d'un mécanisme clastogène. Ces effets sont associés avec une diminution statistiquement significative du niveau de glutathion et une augmentation statistiquement significative du malondialdéhyde montrant une induction de stress oxydant. Ces effets ne sont pas retrouvés avec la forme micrométrique de CeO₂.

Un test des comètes conduit sur fibroblaste humain non transformé (GM07492) par exposition à plusieurs nanoparticules : CeO₂ de 25 nm, TiO₂ de 21 nm et Ag de 100 nm, semble montrer un effet génotoxique du nanoCeO₂ qui pourrait être plus important que celui induit par les nanoparticules de TiO₂ (Franchi *et al.*, 2015).

Les résultats de études *in vitro* montrent que les nanoCeO₂ entraineraient la production d'espèces réactives de l'oxygène à l'origine d'effets génotoxiques de type clastogène.

5.2.2 EFFETS CANCEROGENES

En 2015, l'Allemagne a soumis une demande d'inclusion du dioxyde de cérium au Community rolling action plan (CoRAP) de l'ECHA qui a la charge d'évaluer les effets des substances. La base de cette demande concerne le dioxyde de cérium sans précision de taille des particules. Le dossier repose en partie sur une suspension d'effets cancérigènes et mutagènes (ECHA, 2015).

En effet, plusieurs études sont disponibles concernant le CeO₂ non nanométrique. Une étude d'exposition sub-chronique (90 jours) par inhalation menée suivant la ligne directrice OCDE TG 413 a montré la survenue d'une hyperplasie de l'épithélium alvéolaire et des tissus lymphatiques. Ces données doivent être complétées par des études de durée plus longue (chronique) afin d'évaluer les effets potentiels du fait d'une utilisation de cette substance à des tonnages élevés.

Concernant la forme nanométrique, très peu de données sont disponibles. Du fait des mécanismes identifiés avec les nanoparticules, il est attendu une inflammation pulmonaire et une hyperplasie avec le nanoCeO₂. Ces effets pouvant être induits par la génération d'espèces réactives de l'oxygène lors d'une exposition au

nanoCeO₂, ils pourraient être à l'origine d'une augmentation des altérations tissulaires et des effets génotoxiques. En l'absence d'éléments suffisants, il n'est pas possible de conclure quant au potentiel génotoxique et cancérigène du nanoCeO₂.

5.3 EFFETS SUR LE DEVELOPPEMENT OU LA REPRODUCTION

Seul le résumé d'une étude préliminaire combinée pour les effets sur la reproduction et le développement est disponible pour une exposition à des doses de 0 – 100 – 300 - 1 000 mg.kg⁻¹ de nanoCeO₂ par gavage chez le rat. Seule une augmentation du poids corporel des petits (F1) est observée à la plus forte dose (Lee *et al.*, 2016).

6. ETABLISSEMENT D'UNE RELATION DOSE EFFET

6.1 VALEURS EXISTANTES

A notre connaissance, il n'existe pas de valeurs toxicologiques de référence disponibles pour des expositions environnementales par voie respiratoire aux nanoCeO₂.

Cependant, l'US EPA a déterminé une concentration de référence (RfC) pour les particules de dioxyde de cérium de diamètre aérodynamique moyen de 2,0 µm ne s'appliquant pas aux particules de plus petit diamètre dont les nanoparticules. La valeur proposée est $RfC = BMCL_{HEC} \times 1/1\ 000 = 9.10^{-4} \text{ mg.m}^{-3}$ pour une augmentation de l'incidence d'une hyperplasie de l'épithélium alvéolaire chez le rat (**US-EPA, 2009**). Cette valeur n'est donc pas applicable à la forme nanométrique, elle est rapportée ici à titre d'information.

6.2 PROPOSITION DE L'INERIS

Dans la mesure où il n'existe pas de données relatives aux expositions par voie orale, la seule voie d'exposition qui sera donc développée ici est la voie respiratoire. En effet, une approche par voie extrapolation voie à voie n'est généralement pas recommandée et ne semble pas adaptée pour les nanoparticules du fait des mécanismes attendus (INERIS, 2016).

La nature des nanoparticules rend difficile 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 (Podila et Brown, 2013).

Concernant le dioxyde de cérium sous forme nanoparticulaire, la littérature ne rapporte qu'un nombre limité d'études directement utilisables (études *in vivo* pour des expositions par voie respiratoire et pour des durées d'exposition sub-chroniques ou chroniques). Ces études sont souvent limitées quant à la caractérisation physique de ces particules. Malgré l'insuffisance de la base de données disponible et des incertitudes concernant les effets des différentes formes de nanoparticules de CeO₂, il est proposé d'appliquer la méthodologie habituelle de construction de valeurs repères en toxicologie (AFSSET, 2007, 2010 ; ANSES, 2015).

Les études d'exposition aiguë par voie intratrachéale ont également montré des effets pulmonaires (inflammation, cytotoxicité, fibrose...). De plus, plusieurs études ont mis en évidence l'induction de biomarqueurs pour des effets hépatiques cardiaques, rénaux ou niveau du système nerveux central et de la rate. Ces données sont également soutenues par trois études montrant des atteintes possibles au niveau cérébral lors d'exposition intraveineuses. Cependant, les résultats des effets autres que pulmonaires sont parcellaires et ne peuvent pas être utilisés ici.

Ainsi, les seuls effets utilisables pour le moment dans le cadre de la détermination d'une valeur repère sont donc les effets pulmonaires observés dans les études d'exposition par voie respiratoire pour une durée d'exposition appropriée c'est-à-dire sub-chronique ou chronique.

Il faut toutefois noter que plusieurs paramètres peuvent modifier ces effets comme la taille des nanoparticules ou l'enrobage. De plus, la capacité du dioxyde de cérium à changer d'état de valence pourrait également entraîner des modifications quant à sa capacité à induire un stress oxydant (Dunnick *et al.*, 2016 ; Naganuma et Traversa, 2014 ; Pulido-Reyes *et al.*, 2015).

6.2.1 EFFETS A SEUIL

- **Choix de l'étude de référence**

Pour la construction de valeur toxicologique repère pour des expositions par voie respiratoire, les seules données expérimentales utilisables sont celles issues d'études *in vivo* pour la voie d'exposition appropriée.

L'étude la plus pertinente pour l'élaboration d'une valeur pour des expositions chroniques est l'étude de Keller (2015) qui est une étude d'exposition chronique sur 52 semaines présentant les niveaux d'effet les plus bas. Les résultats préliminaires témoignent d'une réaction inflammatoire au niveau du liquide de lavage bronchoalvéolaire ce qui est compatible avec le profil toxicologique de la substance. Cette étude montre que les effets les plus sensibles sont ceux observés chez les rats femelles avec une nanoparticule bien décrite (NM-212, diamètre 40 nm) pour laquelle une mesure de la charge pulmonaire permet d'objectiver le lien avec l'exposition.

Les résultats préliminaires de l'analyse histopathologique sont disponibles pour un nombre restreint d'animaux après un an d'exposition. Cette analyse a montré la déposition de nanoparticules dans les macrophages au niveau alvéolaire et sous épithélial et différentes altérations histologiques en lien avec le phénomène d'inflammation. Ces altérations correspondent à une infiltration pulmonaire de cellules inflammatoires augmentée de manière statistiquement significative dès $0,3 \text{ mg.m}^{-3}$ et une hyperplasie, une fibrose et des granulomes qui surviennent de manière dose-dépendante et sont augmentées de manière statistiquement significative à partir de 1 mg.m^{-3} . Aucune lésion néoplasique ou pré-néoplasique n'a été rapportée.

Cependant, seul des résultats préliminaires (analyse du liquide de lavage broncho-alvéolaire, hématologie et protéine de phase aiguë dans le sang et analyse histopathologique limitée) de cette étude sont à l'heure actuelle accessibles au sein d'un travail de thèse.

Les premiers résultats de cette étude sont de bonne qualité.

Ils sont confortés par ceux d'autres études réalisées pour des durées d'exposition plus courtes, sub-chronique (Keller, 2015) et subaiguës (Aalapati *et al.*, 2014 ; Gosens *et al.*, 2014).

- **Choix de l'effet critique**

L'effet critique retenu est un effet pulmonaire : une augmentation du nombre de neutrophiles et une cytotoxicité. Seule une augmentation des gamma-GT est observée à la concentration la plus faible (0,1 mg.m⁻³), cette concentration peut-être retenue comme la concentration sans effet nocif (NOAEC). A la concentration directement supérieure (0,3 mg.m⁻³), des effets inflammatoires pulmonaires sont rapportés avec une augmentation statistiquement significative des neutrophiles et des lymphocytes associée à une augmentation statistiquement significative des gamma-GT et de la MCP-1. Compte tenu du caractère inflammatoire bien décrit pour cette nanoparticule, cette concentration pourra être retenues comme LOAEC.

- **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 0,1 mg.m⁻³, un ajustement au temps est réalisé pour passer d'une exposition discontinue à continue (6h/24h x 5j/7j), soit une concentration ajustée :

$$\text{NOAEC}_{\text{ADJ}} = 0,1 \times (6/24) \times (5/7) = 0,018 \text{ mg.m}^{-3} \text{ soit } 18 \text{ }\mu\text{g.m}^{-3}$$

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 (10),
- la variabilité au sein de l'espèce humaine (10),
- l'accès à des résultats uniquement préliminaires (les résultats d'histopathologie n'étant pas disponibles actuellement) (3)
- et pour prendre en compte les effets non évalués comme ceux potentiels sur l'appareil reproducteur ou ceux pour lesquels des effets sont suspectés (système nerveux central, effets hépatiques...) (3)

soit un facteur d'incertitude global de $10 \times 10 \times 3 \times 3 = 900$.

Aucun facteur n'a été retenu pour prendre en compte la variabilité des nanoparticules, car celle utilisée dans l'étude a une taille approximative de 40 nm ce qui permet une bonne diffusion de ces nanoparticules dans les alvéoles pulmonaires (Loret, 2017) et devrait correspondre à une forte réactivité. Elle peut être considérée comme représentative des différentes formes, mais toute extrapolation à d'autres nanoparticules devrait être examinée au cas par cas.

Cette valeur est proposée sur la base des premiers résultats d'une étude chronique, l'absence de l'ensemble des résultats ne permet pas de fournir une évaluation satisfaisante et nécessite l'ajout d'un facteur d'incertitude pour couvrir d'éventuels effets qui n'auraient pas été observés dans les seuls résultats disponibles.

De plus, seuls les effets pulmonaires ont été pris en compte bien que les résultats des études relatives à d'autres voies d'exposition ou à des durées d'exposition plus courtes semblent indiquer d'autres effets potentiels qui n'ont pas été évalués dans les études de toxicité chronique par inhalation. Ainsi, une étude d'exposition subaiguë (28 jours) par inhalation chez la souris a montré des effets hépatiques et rénaux en plus d'une fibrose pulmonaire (Aalapati et al., 2014).

Ainsi, il est conseillé de réévaluer cette valeur dès que l'ensemble des résultats de l'étude de Keller (2015) sera disponible.

Valeur préliminaire proposée :

$$\text{NOAEC}_{\text{ADJ}} \times 1/900 = 0,018 \text{ mg.m}^{-3} \times 1/900 = 2.10^{-5} \text{ mg.m}^{-3} = 20 \text{ ng.m}^{-3}$$

6.2.2 EFFETS SANS SEUIL

En l'absence d'éléments suffisants relatifs aux données de génotoxicité et de cancérogenèse, il n'est pas possible de conclure sur la nécessité d'établir une valeur pour les effets sans seuil.

7. CONCLUSION

Les recherches réalisées lors de ce travail indiquent qu'il n'existe pas de valeur spécifique pour des expositions professionnelles ou environnementales aux dioxyde de cérium nanoparticulaire, que ce soit par voie orale ou par inhalation.

En l'absence d'étude par voie orale, aucune valeur n'est proposée pour cette voie d'exposition.

Afin de pouvoir prévenir les populations exposées des risques potentiels aux nanoCeO₂, l'INERIS a développé une valeur repère préliminaire pour la voie respiratoire.

Cette valeur a été établie à partir des résultats préliminaires d'une étude chronique chez le rat de Keller., 2015 en retenant une NOAEC de 0,1 mg.m⁻³ pour une augmentation du nombre de neutrophile et une cytotoxicité pulmonaire. La nanoparticule de CeO₂ utilisée est la NM-212. Un facteur d'incertitude de 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'utilisation de résultats uniquement préliminaires 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 CeO₂ sous forme nanoparticulaire.

Compte tenu de ces incertitudes, il est conseillé de réévaluer cette valeur dès que l'ensemble des résultats de l'étude de Keller (2015) seront disponibles.

- **Voie respiratoire (effets à seuil) : 20 ng.m⁻³**
- **Voie respiratoire (effets sans seuil) : données insuffisantes**
- **Voie orale (effets à seuil / sans seuil) : données insuffisantes**

Il est rappelé que compte tenu de la grande variation des caractéristiques des différentes nanoparticules de CeO₂ 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 CeO₂. De plus, ces valeurs sont préliminaires et pourront être révisées en fonction de l'évolution des connaissances relatives aux effets des nanoparticules de CeO₂ ou aux méthodes de calcul.

8. BIBLIOGRAPHIE

- Aalapati S., Ganapathy S., Manapuram S., Anumolu G. and Prakya B.M.** (2014) - Toxicity and bio-accumulation of inhaled cerium oxide nanoparticles in CD1 mice. *Nanotoxicology*, **8**, 7, 786-798.
- 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>
- Benameur L., Auffan M., Cassien M., Liu W., Culcasi M., Rahmouni H., Stocker P., Tassistro V., Bottero J.-Y., Rose J., Botta A. and Pietri S.** (2015) - DNA damage and oxidative stress induced by CeO₂ nanoparticles in human dermal fibroblasts: Evidence of a clastogenic effect as a mechanism of genotoxicity. *Nanotoxicology*, **9**, 6, 696-705.
- BRL** (1994) - Final report for a 90-day inhalation neurotoxicity and toxicity study by exposure to a dry powder aerosol of ceric oxide in the albino rat with cover letter dated 013095. Produced by Bio-Research Laboratories, Montreal, Canada for Rhone-Poulenc Inc. Submitted under TSCA Section 8E; EPA Doc. No. 89-950000107; NTIS No. OTS0556254. [An external peer review was conducted by EPA in August 2006 to evaluate the accuracy of experimental procedures, results, and interpretation and discussion of the findings presented. A report of this peer review is available through the EPA's IRIS Hotline, at (202) 566-1676 (phone), (202) 566-1749 (fax), or hotline.iris@epa.gov (e-mail address) and on the IRIS website (www.epa.gov/iris).].
- 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.
- Cordelli E., Keller J., Eleuteri P., Villani P., Ma-Hock L., Schulz M., Landsiedel R. and Pacchierotti F.** (2017) - No genotoxicity in rat blood cells upon 3- or 6-month inhalation exposure to CeO₂ or BaSO₄ nanomaterials. *Mutagenesis*, **32**, 1, 13-22.
- De Marzi L., Monaco A., De Lapuente J., Ramos D., Borrás M., Di Gioacchino M., Santucci S. and Poma A.** (2013) - Cytotoxicity and Genotoxicity of Ceria Nanoparticles on Different Cell Lines in Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 2, 3065-3077.

- Demokritou P., Gass S., Pyrgiotakis G., Cohen J.M., Goldsmith W., McKinney W., Frazer D., Ma J., Schwegler-Berry D., Brain J. and Castranova V.** (2013) - An in vivo and in vitro toxicological characterisation of realistic nanoscale CeO₂ inhalation exposures. *Nanotoxicology*, **7**, 8, 1338-1350.
- Dunnick K.M., Morris A.M., Badding M.A., Barger M., Stefaniak A.B., Sabolsky E.M. and Leonard S.S.** (2016) - Evaluation of the effect of valence state on cerium oxide nanoparticle toxicity following intratracheal instillation in rats. *Nanotoxicology*, **10**, 7, 992-1000.
- ECHA** (2015) - Justification for the selection of a substance for CoRAP inclusion : Cerium Dioxyde. European Chemicals Agency. https://echa.europa.eu/documents/10162/13628/corap_justification_215-150-4_de_en_2814_en.pdf/02056497-051a-489f-b8a4-8e5720d0212e9p
- 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>
- Franchi L.P., Manshian B.B., de Souza T.A.J., Soenen S.J., Matsubara E.Y., Rosolen J.M. and Takahashi C.S.** (2015) - Cyto- and genotoxic effects of metallic nanoparticles in untransformed human fibroblast. *Toxicology in Vitro*, **29**, 7, 1319-1331.
- Geraets L., Oomen A.G., Schroeter J.D., Coleman V.A. and Cassee F.R.** (2012) - Tissue Distribution of Inhaled Micro- and Nano-sized Cerium Oxide Particles in Rats: Results From a 28-Day Exposure Study. *Toxicological Sciences*, **127**, 2, 463-473.
- Gosens I., Mathijssen L.E.A.M., Bokkers B.G.H., Muijser H. and Cassee F.R.** (2014) - Comparative hazard identification of nano- and micro-sized cerium oxide particles based on 28-day inhalation studies in rats. *Nanotoxicology*, **8**, 6, 643-653.
- Hardas S.S., Sultana R., Warriar G., Dan M., Florence R.L., Wu P., Grulke E.A., Tseng M.T., Unrine J.M., Graham U.M., Yokel R.A. and Butterfield D.A.** (2012) - Rat brain pro-oxidant effects of peripherally administered 5 nm ceria 30 days after exposure. *NeuroToxicology*, **33**, 5, 1147-1155.
- Hardas S.S., Sultana R., Warriar G., Dan M., Wu P., Grulke E.A., Tseng M.T., Unrine J.M., Graham U.M., Yokel R.A. and Butterfield D.A.** (2014) - Rat hippocampal responses up to 90 days after a single nanoceria dose extends a hierarchical oxidative stress model for nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology*, **8**, sup1, 155-166.
- Hartmann N.B., Ågerstrand M., Lützhøft H.-C.H. and Baun A.** (2017) - NanoCRED: A transparent framework to assess the regulatory adequacy of ecotoxicity data for nanomaterials – Relevance and reliability revisited. *NanoImpact*, **6**, 81-89.
- HEI** (2001) - Evaluation of Human health Risk from Cerium Added to Diesel Fuel. Health Effects Institute. <https://www.healtheffects.org/system/files/Cerium.pdf64p>
- Hirst S.M., Karakoti A., Singh S., Self W., Tyler R., Seal S. and Reilly C.M.** (2013) - Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environmental Toxicology*, **28**, 2, 107-118.
- 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** (2017) - Note d'avancement de l'analyse des données relatives aux effets sur la santé humaine des nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO₂). Document référence "DRC-17-163635-03084A". Institut National de l'EnviRonnement Industriel et des Risques. 11p

- 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** (2016a) - Dossier INRS : Nanomatériaux, nanoparticules : Effets sur la santé. . Institut National de Recherche et de Sécurité. 13 - 15
- INRS** (2016b) - Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France. Institut National de Recherche et de Sécurité. www.inrs.fr/dms/inrs/CataloguePapier/ED/TI-ED-984/ed984.pdf32p
- JRC** (2014) - Cerium Dioxide, NM-211, NM-212, NM-213. Characterisation and test item preparation. European Commission :Joint Research Center. <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC89825/lbna26649enn.pdf> 88p
- Keller J., Wohlleben W., Ma-Hock L., Strauss V., Gröters S., Küttler K., Wiench K., Herden C., Oberdörster G., van Ravenzwaay B. and Landsiedel R.** (2014) - Time course of lung retention and toxicity of inhaled particles: short-term exposure to nano-Ceria. *Archives of Toxicology*, **88**, 11, 2033-2059.
- Keller J.** (2015) Biokinetics and inhalation toxicity of cerium dioxide and barium sulfate nanoparticles after 1, 4, 13 and 52 weeks of exposure. *Universitätsbibliothek*.
- Kim Y.H., Boykin E., Stevens T., Lavrich K. and Gilmour M.I.** (2014) - Comparative lung toxicity of engineered nanomaterials utilizing in vitro, ex vivo and in vivo approaches. *Journal of Nanobiotechnology*, **12**, 47.
- Klimisch H.J., Andreae M. and Tillmann U.** (1997) - A Systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicological and Ecotoxicological Data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **25**, 1, 1-5.
- Kumari M., Kumari S.I. and Grover P.** (2014a) - Genotoxicity analysis of cerium oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration. *Mutagenesis*, **29**, 6, 467-479.
- Kumari M., Kumari S.I., Kamal S.S.K. and Grover P.** (2014b) - Genotoxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **775–776**, 7-19.
- Lee J., Yu W.-J., Jeong J.-S., Park K., Park J., Lee H., Lee J., Kim P., Choi K., Kim H.-M., Cho K.-J., Moon K.-N. and Chung M.-K.** (2016) - Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test of cerium oxide nanoparticles in rats. *Reproductive Toxicology*, **64**, 36.
- Loret T.** (2017) Capacité de modèles in vitro de complexité différente à prédire les réponses toxiques pulmonaires observées in vivo après exposition aiguë à des nanoparticules de TiO₂ et de CeO₂. *Thèse. Université de technologie de Compiègne*.
- Ma J., Mercer R.R., Barger M., Schwegler-Berry D., Cohen J.M., Demokritou P. and Castranova V.** (2015) - Effects of amorphous silica coating on cerium oxide nanoparticles induced pulmonary responses. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **288**, 1, 63-73.
- Ma J.Y., Zhao H., Mercer R.R., Barger M., Rao M., Meighan T., Schwegler-Berry D., Castranova V. and Ma J.K.** (2011) - Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats. *Nanotoxicology*, **5**, 3, 312-325.
- Ma J.Y., Mercer R.R., Barger M., Schwegler-Berry D., Scabilloni J., Ma J.K. and Castranova V.** (2012) - Induction of pulmonary fibrosis by cerium oxide nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **262**, 3, 255-264.

- Ma J.Y.C., Young S.-H., Mercer R.R., Barger M., Schwegler-Berry D., Ma J.K. and Castranova V.** (2014) - Interactive effects of cerium oxide and diesel exhaust nanoparticles on inducing pulmonary fibrosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **278**, 2, 135-147.
- Molina R.M., Konduru N.V., Jimenez R.J., Pyrgiotakis G., Demokritou P., Wohlleben W. and Brain J.D.** (2014) - Bioavailability, distribution and clearance of tracheally instilled, gavaged or injected cerium dioxide nanoparticles and ionic cerium. *Environmental Science: Nano*, **1**, 6, 561-573.
- Morimoto Y., Izumi H., Yoshiura Y., Tomonaga T., Oyabu T., Myojo T., Kawai K., Yatera K., Shimada M., Kubo M., Yamamoto K., Kitajima S., Kuroda E., Kawaguchi K. and Sasaki T.** (2015) - Pulmonary toxicity of well-dispersed cerium oxide nanoparticles following intratracheal instillation and inhalation. *Journal of Nanoparticle Research*, **17**, 11, 442.
- Naganuma T. and Traversa E.** (2014) - The effect of cerium valence states at cerium oxide nanoparticle surfaces on cell proliferation. *Biomaterials*, **35**, 15, 4441-4453.
- Nalabotu S.K., Kolli M.B., Triest W.E., Ma J.Y., Manne N.D.P.K., Katta A., Addagarla H.S., Rice K.M. and Blough E.R.** (2011) - Intratracheal instillation of cerium oxide nanoparticles induces hepatic toxicity in male Sprague-Dawley rats. *International Journal of Nanomedicine*, **6**, 2327-2335.
- NanoCare** (2009) - Health related Aspects of Nanomaterials: Final Scientific Report. Bundesministerium für Bildung und Forschung. Germany. http://www.nanopartikel.info/files/projekte/NanoCare/NanoCare_Final_Report.pdf158 p
- Nanoreg** (2017) - Deliverable D 4.07: Histopathological evaluation (all organs). Immunohistochemical detection of local and systemic genotoxicity. <http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=87d8a276-2ebd-4a9e-a011-c257ba97c5ed&type=org&disposition=inline15p>
- Nemmar A., Yuvaraju P., Beegam S., Fahim M.A. and Ali B.H.** (2017) - Cerium Oxide Nanoparticles in Lung Acutely Induce Oxidative Stress, Inflammation, and DNA Damage in Various Organs of Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2017**, 12.
- Oberdorster G., Oberdorster E. and Oberdorster J.** (2005) - Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, **113**.
- OCDE** (2015) - Dossier on cerium oxide. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 45. Organisation de Coopération et de Développement Économiques. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MO/NO\(2015\)8&docLanguage=En195p](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MO/NO(2015)8&docLanguage=En195p)
- Park B., Martin P., Harris C., Guest R., Whittingham A., Jenkinson P. and Handley J.** (2007) - Initial in vitro screening approach to investigate the potential health and environmental hazards of Envirox™ – a nanoparticulate cerium oxide diesel fuel additive. *Particle and Fibre Toxicology*, **4**, 1, 12.
- Park E.-J., Cho W.-S., Jeong J., Yi J.-h., Choi K., Kim Y. and Park K.** (2010) - Induction of Inflammatory Responses in Mice Treated with Cerium Oxide Nanoparticles by Intratracheal Instillation. *Journal of Health Science*, **56**, 4, 387-396.
- Pauluhn J.** (2011) - Poorly soluble particulates: searching for a unifying denominator of nanoparticles and fine particles for DNEL estimation. *Toxicology*, **279**.
- Peng L., He X., Zhang P., Zhang J., Li Y., Zhang J., Ma Y., Ding Y., Wu Z., Chai Z. and Zhang Z.** (2014) - Comparative Pulmonary Toxicity of Two Ceria Nanoparticles with the Same Primary Size. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 4, 6072-6085.

- Podila R. and Brown J.M.** (2013) - Toxicity of Engineered Nanomaterials: A Physicochemical Perspective. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, **27**, 1, 50-55.
- Pulido-Reyes G., Rodea-Palomares I., Das S., Sakthivel T.S., Leganes F., Rosal R., Seal S. and Fernández-Piñas F.** (2015) - Untangling the biological effects of cerium oxide nanoparticles: the role of surface valence states. *Scientific Reports*, **5**, 15613.
- Rice K.M., Nalabotu S.K., Manne N.D.P.K., Kolli M.B., Nandyala G., Arvapalli R., Ma J.Y. and Blough E.R.** (2015) - Exposure to Cerium Oxide Nanoparticles Is Associated With Activation of Mitogen-activated Protein Kinases Signaling and Apoptosis in Rat Lungs. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, **48**, 3, 132-141.
- Srinivas A., Rao P.J., Selvam G., Murthy P.B. and Reddy P.N.** (2011) - Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. *Toxicology Letters*, **205**, 2, 105-115.
- Tseng M.T., Lu X., Duan X., Hardas S.S., Sultana R., Wu P., Unrine J.M., Graham U., Butterfield D.A., Grulke E.A. and Yokel R.A.** (2012) - Alteration of hepatic structure and oxidative stress induced by intravenous nanoceria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **260**, 2, 173-182.
- Tseng M.T., Fu Q., Lor K., Fernandez-Botran G.R., Deng Z.-B., Graham U., Butterfield D.A., Grulke E.A. and Yokel R.A.** (2014) - Persistent Hepatic Structural Alterations Following Nanoceria Vascular Infusion in the Rat. *Toxicologic Pathology*, **42**, 6, 984-996.
- US-EPA** (2009) - Toxicological review of Cerium Oxide and Cerium Compounds. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/1018tr.pdf118p
- Xiao H., Haifeng Z., Yuhui M., Wei B., Zhiyong Z., Kai L., Yayun D., Yuliang Z. and Zhifang C.** (2010) - Lung deposition and extrapulmonary translocation of nano-ceria after intratracheal instillation. *Nanotechnology*, **21**, 28, 285103.
- Yokel R.A., Florence R.L., Unrine J.M., Tseng M.T., Graham U.M., Wu P., Grulke E.A., Sultana R., Hardas S.S. and Butterfield D.A.** (2009) - Biodistribution and oxidative stress effects of a systemically-introduced commercial ceria engineered nanomaterial. *Nanotoxicology*, **3**, 3, 234-248.
- Yokel R.A. and MacPhail R.C.** (2011) - Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)*, **6**, 7-7.
- Yokel R.A., Hussain S., Garantziotis S., Demokritou P., Castranova V. and Cassee F.R.** (2014) - The yin: an adverse health perspective of nanoceria: uptake, distribution, accumulation, and mechanisms of its toxicity. *Environmental Science: Nano*, **1**, 5, 406-428.



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>