

Direction de l'évaluation des risques

Groupe d'expertise collective en urgence « TiO₂ »

Procès-verbal de la réunion du « 24 mars 2017 »

Considérant le décret n° 2012-745 du 9 mai 2012 relatif à la déclaration publique d'intérêts et à la transparence en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, ce procès-verbal retranscrit de manière synthétique les débats d'un collectif d'experts qui conduisent à l'adoption de conclusions. Ces conclusions fondent un avis de l'Anses sur une question de santé publique et de sécurité sanitaire, préalablement à une décision administrative. Les avis de l'Anses sont publiés sur son site internet (www.anses.fr).

Etaient présent(e)s :

- Membres
 - Mmes. Valérie FESSARD et Paule VASSEUR
 - MM. Jacques BELEGAUD, Claude LAMBRE, Fabrice NESSLANY
- Agents de l'Anses en charge du GT ESPA.

Saisine traitée

La saisine ayant fait l'objet d'une validation est la suivante : demande d'avis relatif à l'exposition alimentaire aux nanoparticules de dioxyde de titane (saisine 2017-SA-0020).

Présidence

M Fabrice NESSLANY assure la présidence de la séance.

Gestion des risques de conflits d'intérêts

Le président, après avoir vérifié en début de réunion que les experts n'aient pas de liens d'intérêts à déclarer, précise que l'analyse des liens déclarés n'a pas mis en évidence de risque de conflit au regard de la saisine traitée.

Synthèse des débats, détails et explications des votes, y compris les positions divergentes

Le président vérifie que le quorum est atteint avec 5 membres sur 5 ne présentant pas de risque de conflit d'intérêt.

L'expertise relève du domaine de compétences du groupe d'expertise collective en urgence (GECU) « TiO₂ » réuni le 24 février et le 24 mars 2017, sur la base de rapports d'expertise préparés par les experts du GECU. Ces travaux ont été adoptés par le GECU le 24 mars 2017. Il est rappelé que la saisine 2017-SA-0020 porte sur un avis relatif à l'exposition alimentaire aux nanoparticules de dioxyde de titane. Cette saisine fait suite à la publication de Bettini *et al.* (2017).

Dans le cadre de cette saisine, le GECU a auditionné les auteurs de la publication de Bettini *et al.* en présence de représentants de l'Efsa et de deux de ses experts ainsi que d'un agent de l'ANSM le 9 mars 2017.

L'additif alimentaire E171 est constitué de particules de dioxyde de titane (TiO₂, numéro CAS: 13463-67-7). Le TiO₂ est une substance inorganique présente sous deux formes cristallines majoritaires (anatase et rutile). Les données de la littérature indiquent une grande variabilité concernant la proportion des phases cristallines et la distribution en taille des différents lots de E171 présents dans le commerce. La taille des particules peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres sous une forme dispersée, agrégée ou agglomérée. Le pourcentage de particules considérées comme nanoparticulaires (*i.e.* dont les 3 dimensions sont inférieures ou égales à 100 nm) varie de 0 à 39% en nombre et de 0 à 3,2% en masse (EFSA 2016). L'additif alimentaire E171 est majoritairement utilisé en tant que colorant alimentaire, les niveaux maximaux d'incorporation ont été définis au sein du règlement (CE) n°1333/2008 relatif aux additifs alimentaires. Ainsi, pour les 51 catégories d'aliments répertoriés dans l'annexe II de ce règlement, le E171 peut être utilisé *quantum satis*.

Lors de l'évaluation du TiO₂ sous sa forme additif alimentaire E171, le panel d'expert de l'EFSA n'a pas été en mesure de se prononcer sur les effets immunotoxiques et sur la toxicité liée à la reproduction en l'absence de données robustes. Des études de cancérogénèse ont été menées chez des rats Fischer 344 (50 individus/sexe) à des doses allant de 0 à 2 250 mg de TiO₂.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les mâles et de 0 à 2 900 mg de TiO₂.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les femelles pendant 103 semaines via l'alimentation. Des observations histopathologiques ont été menées sur une trentaine d'organes. Les résultats indiquent que le TiO₂ administré par voie orale (via les aliments) n'est pas cancérogène chez les rats Fischer 344 à ces doses. A partir de ces études de cancérogénèse menées chez le rat et la souris, le panel a fixé la dose sans effet nocif observable à 2 250 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Au vu des données d'exposition rapportées, le panel d'expert de l'Efsa a déterminé une marge de sécurité de 150 à partir de la dose sans effet nocif observable de 2 250 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Dans les lignes directrices relatives aux additifs alimentaires (EFSA, 2012), le panel d'experts considère pour les composés non génotoxiques et non cancérogènes qu'une marge de sécurité d'une valeur de 100 ou plus est jugée comme non préoccupante.

Le groupe d'experts de l'Efsa émet les recommandations suivantes :

- Dans l'optique d'établir une valeur toxicologique de référence pour l'additif alimentaire E171, une étude sur une génération étendue ou multigénérationnelles, respectant les lignes directrices de l'OCDE, devrait être menée avec de l'additif alimentaire E171 conforme aux spécifications de l'UE et dont la distribution en taille serait préalablement caractérisée.

-Les spécifications de l'UE relatives au E171 devraient inclure la caractérisation de la distribution en taille des particules de TiO_2 (gamme, médiane, quartiles) en utilisant les outils statistiques adaptés ainsi que le pourcentage (en nombre et en masse) des nanoparticules utilisées en tant qu'additif alimentaire. Les méthodes de mesures devront être en accord avec le document guide de l'Efsa.

-Les limites maximales concernant les impuretés d'éléments toxiques (arsenic, mercure, cadmium et plomb) mentionnées dans les spécifications de l'UE pour le TiO_2 devraient être révisées afin d'assurer que le E171 ne soit pas une source significative d'exposition à ces éléments.

Le groupe conclut qu'une fois les données relatives à la toxicité pour la reproduction disponibles, une valeur toxicologique de référence pourrait être déterminée.

La demande de cette saisine porte sur l'analyse de la publication de Bettini *et al* (2017). Des méthodes de caractérisation physico-chimiques ont été mises en œuvre pour le E171. Concernant les mesures de taille, la distribution granulométrique primaire déterminée par microscopie électronique à transmission (TEM) variait de 20 à 340 nm (moyenne et écart-type de 118 ± 53 nm) et 44,7% des particules avaient des tailles inférieures à 100 nm de diamètre. Sur les huit paramètres définis dans la norme ISO TR13014:2012, les auteurs ont renseigné : la distribution en taille ; la forme ; l'état d'agglomération/agrégation ; la composition ; la dispersibilité, la chimie de surface et la densité de charge de surface (seule l'aire de surface manque pour le E171). Les paramètres et les outils de caractérisation physico-chimique utilisés apparaissent pertinents et la caractérisation physico-chimique très complète. Des différences de composition et de charges de surfaces ont été relevées entre le E171 et le NM-105. Par conséquent, si l'objectif de cette publication était de chercher à déterminer la part attribuable à la fraction nanométrique d'éventuels effets spécifiques, alors, il aurait été préférable d'effectuer la comparaison avec la seule part nanométrique du E171. Cependant, la faisabilité d'une telle étude reste techniquement difficile à l'heure actuelle.

Dans cette étude, des groupes de rats ont été exposés pendant 7 jours (par gavage) ou 100 jours (par administration dans l'eau de boisson) à un lot de E171 (redispersé par ultrasonication en solution d'albumine de sérum bovin (BSA)) ou à des nanoparticules de TiO_2 de référence (NM-105, Joint Research Center JRC). Les auteurs se sont intéressés au passage de la barrière intestinale, à la distribution dans quelques organes, à la variation de paramètres immunologiques ainsi qu'au potentiel génotoxique et cancérigène (initiation, promotion) du TiO_2 . Suite à l'étape de dispersion du E171 en solution dans la BSA suivie d'une ultrasonication, le GECU s'interroge d'abord sur la représentativité de la forme et de la méthode d'exposition ainsi que de leur éventuel impact sur les effets observés au sein de l'étude. Par ailleurs, l'étape d'ultrasonication peut favoriser la redispersion des nanoparticules engagées dans la structure d'agrégats ou d'agglomérats augmentant ainsi la proportion de nanoparticules au sein de l'échantillon par rapport à du E171 ajouté directement à la matrice alimentaire. Enfin, le fait que les voies d'exposition reposent uniquement sur une exposition en milieu aqueux amène également le GECU à s'interroger sur les différences de biodisponibilité entre le E171 en solution et le E171 intégré dans une matrice alimentaire solide.

Pour l'ensemble de ces raisons, la préparation utilisée de E171 dispersé en solution de BSA puis ultrasoniqué peut apparaître comme peu représentative de l'additif alimentaire E171 tel que présent dans les aliments mais pourrait permettre d'identifier certains dangers associés à des usages du E171.

Trois études ont été menées afin d'évaluer la variation de certains paramètres immunitaires et inflammatoires.

D'un point de vue méthodologique, l'étude sur les effets liés à l'immunité et l'inflammation a été bien conduite. De nombreux paramètres pertinents pour l'étude d'une réponse inflammatoire et immunitaire ont été inclus. Les résultats présentés indiquent qu'il existerait dans la rate, après 7 jours d'exposition, une population de cellules qui serait, après une stimulation spécifique, particulièrement apte à répondre pour produire de l'IFN- γ et, dans une moindre mesure, de l'IL-17. Afin de mieux pouvoir interpréter cette réponse de l'IFN- γ il serait intéressant de disposer des dosages d'IL-4, IL-6 and IL-10 obtenus dans les mêmes conditions ainsi que d'une étude histologique de la rate.

L'étude ne rapporte pas l'apparition d'une réaction inflammatoire caractéristique dans le côlon (changement histologique, infiltration cellulaire) et la notion de « low grade inflammation » est difficilement étayée par les résultats présentés.

Dans l'ensemble, les pourcentages de variations rapportés dans cette étude, lorsqu'ils sont statistiquement significatifs, restent relativement faibles et leur signification biologique reste à confirmer. Par ailleurs, les interprétations données par les auteurs sont des hypothèses de travail possibles mais celles-ci ne sont pas totalement étayées par les résultats. Ainsi, bien qu'ils présentent des modifications pour certains paramètres immunitaires, ils ne sont pas suffisants pour affirmer une déficience (« impairment ») de l'homéostasie immunitaire. Ces résultats sont comparables à ceux déjà rapportés dans la littérature pour les nanoparticules de TiO₂ et qui montrent des réactions dépendantes de la taille des particules utilisées, des conditions de l'administration et de la dose administrée. L'étude rapporte des signes limités (variation du pourcentage de CD, de lymphocytes T_{regs} et T_h) d'une réaction immunitaire locale et systémique.

En conclusion, en ce qui concerne les aspects inflammatoires et immuno-modulateurs, les évaluations actuellement disponibles pour le E171 utilisé en tant qu'additif alimentaire ne sont pas remises en question par les données de cette étude.

Une étude de génotoxicité via le test des comètes a été conduite. Les auteurs de l'étude n'observent pas d'effet génotoxique sur les cellules isolées des plaques de Peyer de rats exposés pendant 7 jours au E171 ou au NM-105 dans le test standard et modifié.

La méthodologie utilisée pour mener le test des comètes n'est pas précisée au sein de l'étude. Il n'est donc pas possible d'évaluer la pertinence du protocole réalisé (conditions de migration, concentration en Fpg, témoins avec tampon enzyme, nombre de comètes étudiées, quantification des « hedgehogs », etc.). Même si la ligne directrice OCDE 489 recommande d'effectuer les mesures 2 à 6 heures après la dernière administration, compte tenu de la persistance possible dans l'organisme des particules pas ou peu solubles, un temps de 24h après la dernière exposition peut être acceptable. La ligne directrice OCDE 489 recommande de réaliser le test avec au moins 3 doses afin de pouvoir mettre en évidence une relation dose-réponse. L'étude de Bettini *et al.* ne comporte qu'une seule dose pour chaque composé testé. Enfin, une représentation graphique permettrait de mieux apprécier la distribution des valeurs et la variabilité de réponse entre les animaux d'un même groupe.

Aucun témoin positif (par exemple le méthyl méthanesulfonate : MMS) n'a été utilisé lors de cette étude contrairement à ce qui est préconisé dans la ligne directrice 489 de l'OCDE. De plus, le test des comètes a été réalisé sur les cellules des plaques de Peyer : il s'agit d'un tissu particulier pour lequel aucune publication avec ce test n'est disponible dans la littérature. Dans ce contexte, il est difficile de conclure quant à la validité de l'essai sur ce type de prélèvements. De même, les résultats avec la Fpg sont discutables. En effet, compte tenu du « stress oxydant » généré par le métabolisme basal des cellules, de nombreuses bases oxydées sont présentes dans les cellules du groupe des témoins. Ceci se traduit par une augmentation des cassures

dans le test des comètes. Cependant, dans la publication, aucune augmentation n'est observée après traitement avec l'enzyme Fpg dans les témoins. L'absence de témoins positifs du stress oxydant ne permet pas de vérifier s'il s'agit ou non d'un problème d'expérimentation (activité et concentration de la Fpg par exemple).

Enfin, des études de cancérogenèse ont porté sur l'apparition et l'évolution de foyers de cryptes aberrantes (FCA) sur des rats, induits ou non par un initiateur, exposés via l'eau de boisson à du E171 (préalablement redispersé en BSA et ultrasoniqué) pendant 100 jours. Ces FCA sont considérés par les auteurs comme étant les lésions histopathologiques les plus précoces en lien avec la formation du cancer colorectal. Ces FCA sont l'unique biomarqueur utilisé dans cette étude pour décrire les lésions prénéoplasiques. Les auteurs de l'étude ont précisé que les FCA dont le nombre de cryptes est supérieur ou égal à 4 étaient considérés comme de « grands FCA ». Une première étude a porté sur l'impact du E171 en tant que promoteur de FCA chez le rat. La seconde étude a porté sur la capacité du E171 à initier l'apparition de FCA chez le rat.

De nombreuses preuves indirectes étayaient l'hypothèse selon laquelle les FCA sont des lésions précancéreuses. Plus précisément, c'est la corrélation entre l'incidence tumorale et le nombre de « grands FCA » qui peut représenter une preuve majeure. Cependant, il ne semble pas exister de définition admise par tous d'un « grand FCA ». Les auteurs ont choisi de mettre un seuil de définition d'un « grand FCA » à plus de 3 cryptes aberrantes / côlon. Pourtant, d'autres auteurs ont fixé ce seuil à 10 cryptes aberrantes. Par ailleurs, une corrélation significative n'établit pas toujours un lien de causalité. Le caractère prédictif d'une incidence tumorale apporté par les « grands FCA » ne fait pas consensus et leur présence ne signifie pas que ces lésions évolueront nécessairement vers le cancer.

Concernant les effets promoteurs, les auteurs n'ont pas observé d'augmentation significative du nombre total de FCA par côlon aux deux doses testées par rapport au contrôle. Cependant, des augmentations statistiquement significatives du nombre de cryptes aberrantes par côlon et du nombre de « grands FCA » par côlon ont été observées exclusivement dans le groupe de rats exposé à 10 mg de E171.kg pc⁻¹.j⁻¹.

Concernant les effets initiateurs, quatre rats sur onze, dans le groupe ayant reçu une dose de 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, présentaient des foyers de cryptes aberrantes dans le côlon, alors qu'aucun des 12 rats du groupe contrôle n'en comportait, la différence entre les deux groupes étant statistiquement significative. Pour trois des quatre rats, le nombre de cryptes aberrantes par foyer était faible (1 à 3). Pour le quatrième rat, un foyer de plus de 12 cryptes aberrantes a été observé, ce qui dénote une lésion plus sévère.

Les auteurs mentionnent également une augmentation modérée mais significative de TNF- α , IL-8 et IL-10 dans la muqueuse du côlon dans le groupe exposé au E171. TNF- α et IL-8 sont rapportées comme pouvant jouer un rôle dans les mécanismes de la cancérogenèse colorectale. Cependant, il n'est pas précisé si ces augmentations sont observées spécifiquement chez les rats présentant des augmentations du nombre de cryptes aberrantes.

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans les potentiels effets promoteurs observés, des études *in vitro* relatives à la cytotoxicité du E171 sur des cellules épithéliales coliques de rat normales (gène Apc non muté (Apc +/+)) ou prénéoplasiques (gène Apc muté (Apc min/+)) ont été menées. Après 24h d'exposition de ces cellules à des doses de 2,56 et 25,6 μ g/mL de E171, la cytotoxicité est plus élevée sur la lignée de cellules épithéliales Apc +/+ que sur la lignée Apc min/+. La même étude a été menée avec le NM-105 aux mêmes doses. D'après les auteurs, l'exposition au NM-105 induit une cytotoxicité préférentielle vis-à-vis des cellules prénéoplasiques. Ainsi, l'hypothèse mécanistique d'une sélection de cellules prénéoplasiques

aux premiers stades du processus de transformation est apportée par les auteurs. Le GECU précise que cette hypothèse n'est pas la seule plausible pour expliquer les effets de promotion enregistrés : par exemple, un déficit des réactions de méthylation par le TiO_2 décrit *in vitro* ainsi que l'induction de miARNs *in vivo* laissent suspecter des mécanismes épigénétiques. La variabilité expérimentale de l'estimation indirecte de la cytotoxicité par la technique au MTT n'étant pas connue dans les conditions expérimentales de l'étude, il est impossible de garantir une quelconque significativité biologique. Il apparaît par conséquent difficile de relier les faibles différences observées à une preuve de la sélection de cellules prénéoplasiques. Enfin, la reproductibilité des résultats obtenus *in vitro* doit toujours être vérifiée ce qui ne semble pas être le cas ici.

Concernant les études de cancérogenèse, les membres du GECU considèrent que la méthodologie employée par les auteurs a suivi un modèle scientifiquement bien établi.

Un effet promoteur potentiel du E171 est observé au niveau du côlon. Si l'augmentation d'apparition des « grands FCA » semble modérée, il est à noter que les FCA sont présumés prédictifs des lésions prénéoplasiques. Ce potentiel promoteur a par ailleurs été rapporté chez la souris après initiation (par azoxyméthane induisant une colite), dans des conditions proches de la présente étude avec une induction tumorale au niveau du côlon (Urrutia-Ortega *et al.*, 2016). Dans l'étude de Bettini *et al.* (2017), la durée de suivi des animaux post exposition est insuffisante pour évaluer l'intensité des effets promoteurs du E171 sur l'incidence tumorale. Sur la base des tests réalisés *in vitro*, cet effet promoteur éventuel ne peut pas être attribué à la fraction nanométrique du E171.

En ce qui concerne le potentiel initiateur du E171, le nombre d'animaux testés est trop faible pour juger de sa significativité. De plus, l'étude d'Urrutia-Ortega *et al.*, (2016) réalisée sur des souris n'a pas rapporté d'effet initiateur du E171.

Pour conclure, les membres du GECU reconnaissent la valeur scientifique de cette publication et les résultats qui en sont issus malgré les limites discutées avec les auteurs lors de leur audition et rapportées ci-dessus. Cette étude apporte de nouveaux éléments par rapport à l'avis de l'Efsa (2016) quant à un potentiel effet promoteur cancérogène du E171. Les membres du GECU émettent les conclusions et recommandations suivantes :

- Concernant les effets liés à l'inflammation observés dans les études *in vivo*, ceux-ci sont modérés et leur significativité biologique n'est pas établie. Par ailleurs, l'apparition d'une réaction inflammatoire caractéristique dans le côlon (changement histologique, infiltration cellulaire) est difficilement étayée par les résultats présentés.
- Concernant l'effet génotoxique au niveau des cellules des plaques de Peyer, l'absence de témoins positifs dans cette étude ainsi que de données historiques avec le test des comètes sur ce tissu ne permettent pas de conclure sur la génotoxicité du E171.
- Enfin, en termes d'évaluation du risque du E171, les résultats présentés ne permettent pas de remettre en cause l'évaluation du E171 menée par l'Efsa et ne peuvent être utilisés sans avoir auparavant été confirmés et complétés en administrant du E171 aux animaux tel qu'il est présent dans la matrice alimentaire. L'effet promoteur potentiel du E171 observé au niveau du côlon nécessite d'être confirmé par des expérimentations intégrant l'utilisation de biomarqueurs supplémentaires et/ou portant sur des durées d'expositions plus longues afin d'évaluer l'induction tumorale. Un groupe supplémentaire composé d'un plus grand nombre d'animaux est nécessaire afin de confirmer ou infirmer un possible effet initiateur du E171.

L'avis est validé à l'unanimité par les membres du GECU

M Fabrice NESSLANY
Président du GECU TiO₂