

Direction de l'évaluation des risques

Groupe de travail **« Evaluation des substances et procédés soumis à autorisation en** **alimentation humaine - ESPA»**

Procès-verbal de la réunion **du « 20 février 2020»**

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. Elmira Arab-Tehrany (par téléphone), Marie-Christine Chagnon, Véronique Coma
 - MM. Claude Atgié (président), Sébastien Antherieu, Michel Baccaunaud, Jalloul Bouajila (par téléphone), Nicolas Cabaton (vice-président), Ronan Cariou, Dany Chevalier, Franck Cleymand (par téléphone), Michel Linder (par téléphone), Georges Lognay, Eric Marchioni, Didier Montet, Philippe Saillard (par téléphone le matin), Patrick Sauvegrain, François Zuber.
- Agents de l'Anses en charge du GT ESPA.

Etaient excusé(e)s, parmi les membres du collectif d'experts :

Mme. Florence Lacoste. Anne Platel

Présidence

M Claude Atgié assure la présidence de la séance pour la journée.

1. ORDRE DU JOUR

Les expertises ayant fait l'objet d'une finalisation et d'une adoption des conclusions sont les suivantes :

1. Demande d'avis scientifique portant sur l'innocuité pour la santé humaine du TMBPF (utilisé comme précurseur) et du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer une résine de type époxyde au contact des denrées alimentaires, en remplacement du BADGE), et le cas



échéant des impuretés, produits de dégradation et oligomères du TMBPF et du TMBPF-DGE (Saisine 2016-SA-0103)

2. GESTION DES RISQUES DE CONFLITS D'INTERETS

M. Nicolas CABATON se déclare en situation de lien d'intérêts sur la saisine 2016-SA-0103. M CABATON a quitté, à chaque séance, la salle de réunion lors des discussions en lien avec cette saisine

L'analyse des liens déclarés des participants n'a pas mis en évidence d'autres risques de conflit d'intérêt au regard des points de l'ordre du jour mentionnés ci-dessus.

3. SYNTHESE DES DEBATS, DETAIL ET EXPLICATION DES VOTES, Y COMPRIS LES POSITIONS DIVERGENTES

Point 1 .1

Synthèse des discussions du GT ESPA

Le président du GT ESPA vérifie que le quorum est atteint avec 17 experts sur 20 présents lors de la validation de cet avis

M CABATON a quitté la salle de réunion lors des discussions en lien avec cette saisine et la validation de l'avis.

Les travaux des rapporteurs ont été présentés au GT ESPA tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques lors des séances du 17 janvier 2019, 17 octobre 2019, 12 décembre 2019 et du 20 février 2020.

Le TMBPF est un matériau précurseur utilisé dans la fabrication du comonomère TMBPF-DGE, servant lui-même à la polymérisation de résines époxydes utilisées dans les revêtements de matériaux en contact avec les denrées alimentaires. Plus précisément, la résine époxyde sera utilisée dans les revêtements d'emballages métalliques dédiés à tous types de denrées alimentaires (aqueuses, acides, alcoolisées et contenant des aliments gras).

L'Anses a tout d'abord été saisie le 2 juin 2015 par la DGCCRF pour la réalisation de l'expertise suivante : « demande d'avis portant sur l'innocuité pour la santé humaine du TMBPF (utilisé comme précurseur) et du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer une résine de type époxyde au contact des denrées alimentaires, en remplacement du BADGE), et le cas échéant à leurs impuretés, produits de dégradation et oligomères » (saisine n°2015-SA-0117). Conformément aux lignes directrices en vigueur de l'EFSA et à l'avis du CSHPF du 14 octobre 1997, deux dossiers dédiés au TMBPF et TMBPF-DGE avaient été élaborés par le pétitionnaire et fournis à l'Anses pour évaluation.

Le 17 février 2016, l'Anses a rendu un avis relatif à cette saisine dans lequel elle a conclu qu'en l'absence des données expérimentales nécessaires à la caractérisation physicochimique et du danger, elle n'était pas en mesure de se prononcer sur l'innocuité du TMBPF, du TMBPF-DGE et de ses produits de dégradation et oligomères

En réponse aux interrogations de l'Anses, le pétitionnaire a fourni à l'Agence des données complémentaires. Ces compléments ont été examinés par l'Anses et de nouvelles demandes de compléments d'informations ont été transmises au pétitionnaire le 8/11/2016.



Ainsi, l'avis 2016-SA-0103 compile l'expertise du GT ESPA concernant les documents fournis par le pétitionnaire suite à la première demande de complément d'information publiée dans l'avis 2015-SA-0117 et la seconde demande de compléments d'information datant du 8/11/2016.

➤ **Partie en lien avec la caractérisation physico-chimique**

Au cours de la réunion du 17 octobre 2019, les discussions ont porté sur l'expertise et les conclusions en lien avec la partie physico-chimique du dossier. Les principaux points discutés sont résumés ci-dessous.

Données relatives à la stabilité thermique du TMBPF-DGE

La documentation complémentaire fournie par le pétitionnaire comporte un rapport sur les propriétés physico-chimiques du TMBPF-DGE, notamment les résultats d'une analyse thermogravimétrique (TGA). La courbe d'analyse TGA du TMBPF-DGE montre une perte de masse significative au-delà de 350°C qui atteint 25% à 384°C (voir figure 1).

Selon les données de TGA communiquées par le pétitionnaire, le TMBPF-DGE est stable jusqu'à 350°C. Dans le dossier initial, les mesures de température maximales effectuées sur le métal lors du durcissement des résines à base de TMBPF-DGE étaient comprises entre 230°C et 250°C. De plus, la température maximale d'utilisation des vernis à base de TMBPF-DGE au contact des aliments est annoncée par le pétitionnaire à 130°C. Par conséquent, le TMBPF-DGE est stable jusqu'à 350°C dans les conditions de l'étude, cependant ces dernières ne reflètent pas forcément les conditions réelles d'emploi du matériau. En effet, le GT a mis en lumière que des informations en lien avec les conditions expérimentales (atmosphère utilisée lors de l'analyse TGA) et concernant les barèmes temps/températures sont manquantes.

Précisions sur la résistance de la cellule de migration

Les spécifications de la cellule de migration (conception, matériaux, montage des échantillons au contact des simulants) sont adaptées à des mises en contact dans des conditions de stérilisation (température maximale = 130°C et pression maximale = 280 kPa). Le laboratoire contrôle l'étanchéité de ces cellules et indique que celle-ci se situe dans les limites fixées en interne. Des précisions sur les résultats de ces contrôles d'étanchéité, et en particulier sur le taux de récupération de simulant à l'issue de la mise en contact, permettraient de mieux apprécier le respect des critères de la norme CEN¹ (taux de récupération supérieur ou égale à 90%).

Niveaux de migration des oligomères migrant dans les simulants alimentaires réglementaires

Les éléments fournis par le pétitionnaire n'ont pas complètement levé le doute quant à la quantité maximale d'oligomères et de produits de dégradation liés au TMBPF-DGE qui pourraient migrer dans les différentes catégories de denrées alimentaires. Dans ce contexte, les éléments listés ci-dessous ont été transmis au pétitionnaire afin qu'il puisse fournir de nouvelles données :

- les quantités de substances avec fonction oxirane, obtenues dans les simulants réglementaires (acide acétique 3%, éthanol 20% et éthanol 50%) après contact avec le vernis, sont plus faibles que celles obtenues dans l'acétonitrile où sont dénombrées 6 substances à hauteur de 471 µg/6dm². Ces résultats indiquent que, dans des conditions acides, une partie des composés à fonction oxirane subit une hydrolyse. Le GT ESPA s'interroge sur l'identité et le devenir des hydrolysats associés à la disparition de certains

¹ Comité européen de normalisation



de ces composés à fonction oxirane. Par conséquent, le GT ESPA réitère sa recommandation d'identifier et de quantifier les produits de dégradation éventuels des composés à fonction oxirane.

- en ce qui concerne le test de migration dans l'acide acétique 3%, le GT ESPA s'étonne du fait que dans des conditions de 1h à 121°C, un nombre plus important de composés à fonction oxirane soit généré par rapport aux conditions de 1h à 121°C suivi de 10j à 60°C. Il conviendrait d'expliquer ce phénomène.
 - de manière générale, en ce qui concerne les tests de migration, le GT ESPA souhaiterait avoir des informations statistiques plus précises concernant les résultats des niveaux de migration (valeurs minimum et maximum obtenues, écart-types) afin d'avoir une vision de la dispersion des résultats.
 - enfin, dans les 4 simulants alimentaires utilisés, 10 substances différentes à fonction oxirane ont été détectées. Il apparaît notamment que l'une de ces substances (oligomère de rapport m/z 478,2355) ait été retrouvée dans chacun des simulants alimentaires. Pour cette substance, les niveaux de migration obtenus sont compris entre 108 µg/6dm² dans l'acide acétique à 3% et 216 µg/6dm² dans l'acétonitrile. Pour l'ensemble de ces substances à fonction oxirane, il conviendrait de calculer le niveau d'exposition théorique (NET), et au regard de ce résultat et des lignes directrices existantes de fournir les données permettant d'évaluer la toxicité de chacun de ces composés.
- Identification et quantification des composés à fonction oxirane

Concernant les produits à fonction oxirane, seules deux molécules sont identifiées (TMBPF-DGE.H₂O et TMBPF-DGE + HQ). Pour les autres, les fragments de masse issus d'une analyse par GC/MS ont été exploités par le pétitionnaire pour caractériser chaque substance sans qu'aucune proposition de structure chimique ne soit présentée. Le GT estime que cette réponse n'est pas suffisante eu égard à la question posée par l'Anses. De plus, le pétitionnaire mentionne 12 substances à fonction oxirane incluant les hydrolysats, au lieu des 18 substances identifiées par les experts du GT sur la base des données fournies. Concernant la quantification, un étalon de BADGE.H₂O est utilisé, ce qui est acceptable pour le GT.

Explication relative à la baisse du niveau de migration dans les conditions 1h à 121°C + 10 jours à 60°C comparées à la condition 1h à 121°C

Dans les données communiquées lors de la saisine 2015-SA-0117, les résultats de migration du NIAS de rapport m/z 478,2359 étaient de 108 µg/6 dm² pour la condition 1h à 121°C et non détectable pour la condition 1h à 121°C + 10j à 60°C.

Le pétitionnaire a répété cette analyse et observe à nouveau une diminution du niveau de migration pour la condition 1h à 121°C + 10j à 60°C, néanmoins cette diminution est moins prononcée qu'au cours de la première expérience au cours de laquelle le NIAS de rapport m/z 478,2359 n'était pas détecté. Afin d'expliquer la diminution de la migration entre 1h à 121°C seul et 1h à 121°C + 10 jours à 60°C, l'hypothèse avancée par le pétitionnaire est que le NIAS de rapport m/z 478,2359 est réabsorbé par le vernis après les 10 jours de contact à 60°C. Le pétitionnaire ajoute que cette hypothèse est confirmée par le fait qu'une ré-augmentation de la migration est constatée lorsque les conditions 1h à 121°C sont appliquées de nouveau après les 10 jours à 60°C.

L'hypothèse de réabsorption de la substance par le vernis, avancée par le pétitionnaire sur la base des résultats d'analyses complémentaires, n'est pas explicitée (hypothèse possible : changement de l'équilibre en fonction de la température et de la structure du vernis). De plus, aucun des résultats présentés n'est assorti d'écart-type. Le GT n'est pas convaincu par l'argumentaire du



pétitionnaire et souhaite obtenir des éléments sur les phénomènes qui expliqueraient l'hypothèse proposée par le pétitionnaire.

- Informations statistiques sur les analyses de migration

Pour chaque NIAS identifié à partir de la base de données, le pétitionnaire a communiqué pour les données de migration : les 3 valeurs individuelles, la moyenne, l'écart-type, le coefficient de variation, la valeur minimale et maximale.

Le GT a constaté, à l'examen du tableau de données, que certains écarts-types sont très élevés. Les données statistiques présentées par le pétitionnaire sont recevables.

- Calcul du NET pour l'ensemble des substances à fonction oxirane

Le pétitionnaire a calculé le NET pour 12 substances à fonction oxirane comparé aux 10 substances présentes dans le dossier initial et pour lesquelles l'Anses avait demandé un complément d'information. Le GT a identifié 6 substances supplémentaires ce qui porte le total de substances à fonction oxirane à 18. Parmi l'ensemble de ces substances, 6 ont un NET inférieur à 0,5 µg/personne/jour, 11 ont un NET compris entre 0,5 et 50 µg/personne/jour. Enfin, une substance présente un NET supérieur à 50 µg/personne/jour (rapport m/z 520,3037). D'après le pétitionnaire, cette substance n'est pas un produit d'hydrolyse du TMBPF-DGE mais provient de deux ingrédients qui sont le diéthylène glycol monométhyle éther et l'acide méthacrylique. L'acide méthacrylique pourrait correspondre à une substance de départ du copolymère acrylique associé au polymère époxydique. L'usage du diéthylène glycol monométhyle éther n'est pas précisé par le pétitionnaire. Au vu de la valeur du NET, il conviendrait de lever le doute sur la provenance de la substance présentant un rapport m/z de 520,3037 et de fournir les données toxicologiques requises par les lignes directrices.

Au final, le pétitionnaire a bien calculé les NET des substances à fonction oxirane mais 6 substances sont manquantes. Les données toxicologiques requises selon les niveaux de NET ont été évaluées dans les parties relatives à l'expertise toxicologique.

Conclusions relatives aux données physico-chimiques

Le pétitionnaire n'a pas apporté toutes les réponses souhaitées aux questions posées par l'Anses concernant les données physico-chimiques de la saisine. Des incertitudes demeurent sur plusieurs points :

- toutes les substances à fonction oxirane caractérisées par leurs rapport charge/masse (m/z) n'ont pas été identifiées ;
- l'hypothèse de la diminution de la migration d'une substance à fonction oxirane par une réabsorption du vernis après une longue durée de contact à 60°C n'est pas convaincante (différence de taux de migration entre les analyses répétés, absence d'écarts-type pour les mesures, pas d'explication sur les phénomènes mis en jeu) ;
- les NET ont été calculés pour 12 substances à fonction oxirane alors que 18 substances ont été répertoriées dans les documents fournis par le pétitionnaire.

Pour conclure, le GT n'est pas en mesure d'apporter une conclusion définitive à la partie physico-chimique de cette saisine sans obtenir des données ou explications complémentaires pour les éléments cités ci-dessus.

➤ Partie en lien avec la caractérisation du danger



Au cours de la réunion du 12 décembre 2019, les discussions ont porté sur l'expertise et les conclusions en lien avec la partie toxicologique du dossier. Les principaux points discutés sont résumés ci-dessous.

Test des comètes *in vivo* sur pré-estomac et estomac glandulaire pour le TMBPF-DGE et preuves d'exposition systémique pour le TMBPF-DGE et ses métabolites

L'ensemble des résultats obtenus dans le test des comètes *in vivo* (OCDE 489) réalisé chez le rat Sprague-Dawley mâle exposé par voie orale 3 jours consécutifs à des doses allant jusqu'à et incluant la dose de 2000 mg/kg de poids corporel/j démontre l'absence de potentiel de fragmentation de l'ADN du produit TMBPF-DGE au niveau du foie, de l'estomac glandulaire et du duodénum. Ces résultats sont en faveur d'une absence de génotoxicité *in vivo* du TMBPF-DGE administré par voie orale. Les résultats obtenus pour le jéjunum ne peuvent pas être validés mais cela n'impacte pas la conclusion finale du fait de la présence de résultats valides pour un organe systémique, *i.e.* le foie, et 2 autres organes du tractus gastro-digestif, l'estomac glandulaire et le duodénum. Les analyses plasmatiques démontrent que le TMBPF-DGE administré oralement est largement métabolisé en l'un de ses principaux métabolites hydrolysés (VA-031) qui a présenté des concentrations plasmatiques comprises entre ~2 et ~86 ppm selon la dose initiale (soit jusqu'à 2800 fois supérieures à celle du TMBPF-DGE). Ceci démontre la métabolisation du TMBPF-DGE majoritairement en VA-031, le passage dans la circulation sanguine de ce métabolite principal et l'exposition systémique des animaux. Ces résultats permettent de garantir que les organes systémiques (foie et moelle osseuse) ont été réellement et correctement exposés et donc de valider la pertinence des résultats négatifs obtenus vis-à-vis du foie (et de la moelle osseuse investiguée lors de la précédente étude). En conclusion, ces résultats clairement négatifs sont en faveur d'une absence de génotoxicité *in vivo* du TMBPF-DGE par voie orale.

Données de génotoxicité sur les dérivés hydrolysés et chlorés du TMBPF-DGE

Pour répondre à la demande de l'Anses relative à la génotoxicité des dérivés hydrolysés et chlorés du TMBPF-DGE, le pétitionnaire a fait le choix, dans un premier temps, de s'appuyer sur une approche de type « read across » (lecture croisée) en se basant sur les connaissances disponibles sur le bisphénol A diglycidyl éther (BADGE). Pour ce faire, le pétitionnaire a compilé des données expérimentales ainsi que des données prédictives disponibles sur le BADGE et le TMBPF-DGE. Selon le pétitionnaire, le BADGE et ses sous-produits de réaction constituent les « *pires cas* » par rapport au TMBPF-DGE. Ainsi, le fait qu'aucun potentiel oncogénique ne soit présent pour le BADGE et ses chlorhydrines implique qu'il n'y a aucun potentiel oncogénique pour le TMBPF-DGE et ses dérivés chlorés et hydrolysés.

Le GT reconnaît que le travail effectué est intéressant en termes de compilation des données existantes et prédictives. Néanmoins, ces données ne permettent pas pour autant d'affirmer que le BADGE et ses chlorhydrines sont les « *pires cas* » par rapport aux molécules analogues dérivées du TMBPF-DGE. Les 2 seuls vrais points de comparaison sur le plan expérimental sont le test d'Ames et le test du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse avec la réserve forte de l'absence d'exposition qui relativise la portée et la pertinence d'un résultat négatif. La compilation ne reprend pas non plus tous les résultats potentiellement comparables. Par exemple, si le TMBPF-DGE s'est révélé génotoxique au cours du test d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur cellules CHO-WBL aussi bien avec que sans activateur métabolique, le BADGE a induit une augmentation d'aberrations chromosomiques uniquement en présence d'activation². Cela n'est pas en faveur du classement proposé et dans tous les cas cela démontre des réactivités biologiques qui peuvent être différentes.

² Suárez S, Sueiro RA, Garrido J. (2000). Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and a chlorohydrin of BADGE. *Mutat Res.*, 2000, 470, 2: 221-8.



En conclusion, compte tenu des niveaux de migration des dérivés hydrolysés et chlorés du TMBPF-DGE obtenus dans les tests de migration (avis 2015-SA-0117), il est nécessaire que la génotoxicité de ces composés soit testée sur le plan expérimental à travers *a minima* deux tests *in vitro* (un test de mutation génique sur bactéries et un test du micronoyau).

Le pétitionnaire a fourni, en seconde approche, les deux tests de génotoxicité *in vitro* mentionnés précédemment.

- Dérivé dichloré du TMBPF-DGE (VA-034)

- **Test d'Ames**

Sur le plan expérimental, le test d'Ames a été correctement effectué selon la ligne directrice de l'OCDE n°471 et en respectant les BPL. Sur le plan méthodologique, 4 souches de *Salmonella* Typhimurium (TA1535, TA1537, TA98, et TA100) et 1 souche d'*Escherichia coli* (WP2 uvrA/pKM101) ont été utilisées. Afin d'optimiser la mise en évidence de mécanismes de pontages ou d'oxydation, il aurait été préférable d'inclure une souche pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN telle que *Salmonella* Typhimurium TA102 ou *Escherichia coli* WP2 ou WP2 pKM101.

De plus, la stabilité et l'homogénéité du VA-034 dans le véhicule n'ont pas été déterminées dans le cadre de cette étude, de même que l'analyse de la concentration des solutions de traitement. Cependant, l'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation. Toutes les formulations ont été utilisées dans l'heure qui a suivi l'ajout du véhicule à l'élément d'essai. Cette déviation mineure ne remet pas en cause le statut BPL et l'intégrité de l'étude.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de révertants (dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité des souches bactériennes. Dans les conditions expérimentales testées, les résultats ne montrent pas de potentiel mutagène du dérivé dichloré du TMBPF-DGE (VA-034) sur *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98 et TA100, ni sur *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101, avec et sans S9.

- **Test du micronoyau *in vitro***

Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°487 et dans le respect des principes des BPL. Sur le plan expérimental, il est mentionné que l'échantillon était sous forme d'un solide blanc alors qu'il avait été à l'origine décrit sous forme visqueuse et sans couleur. Un aliquote de l'échantillon a donc été analysé et la pureté a été confirmée montrant que la cristallisation n'impactait pas la pureté. La stabilité et l'homogénéité du VA-034 dans le DMSO n'ont pas été vérifiées mais les solutions ont été préparées extemporanément. Il est aussi précisé que l'analyse de la concentration des solutions de traitement n'a pas été menée dans cette étude. Cependant, l'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation. Toutes les formulations ont été utilisées dans les deux heures après l'ajout du DMSO à l'élément d'essai. Ces différents points ne remettent donc pas en cause l'intégrité de l'étude. Par ailleurs, la valeur moyenne de cellules binucléées pour deux conditions de traitements (temps 3h en absence de S9 mix et 20h) est légèrement en dessous (3 au lieu de 3,3 à la plus forte concentration, temps 3h) de l'intervalle de confiance des données de valeurs historiques des témoins solvant et légèrement au-dessus (12 au lieu de 11,5 pour la plus faible concentration, temps 20h) ce qui ne doit pas remettre en cause les critères d'acceptabilité de l'étude. Sur le plan méthodologique, le test du micronoyau a été correctement mené, avec deux temps d'exposition, le DMSO et les témoins positifs des cultures ont été utilisés dans les conditions appropriées. Trois concentrations ont été testées, la concentration maximale testée est cohérente avec les recommandations de la ligne directrice. Les expériences ont été menées sur deux cultures pour les cellules traitées et les témoins positifs et sur quatre cultures pour les témoins solvant.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de cellules binucléées avec des micronoyaux (dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité du système d'étude (lymphocytes humains) dans



ces conditions expérimentales. En conclusion, les résultats ne montrent pas de potentiel clastogène/aneugène du dérivé dichloré du TMBPF-DGE (VA-034) sur les lymphocytes humains en culture que ce soit avec ou sans activation métabolique.

- Dérivé dihydrolysé du TMBPF-DGE (VA-031)

- Test d'Ames

Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°471 et dans le respect des principes des BPL. Sur le plan expérimental, le test d'Ames a été correctement effectué (2 essais indépendants avec et sans S9, plus de 5 doses testées, triplicat/dose, dose maximale testée recommandée, intervalle entre les doses d'environ une demi-unité logarithmique).

Sur le plan méthodologique, 4 souches de *Salmonella* Typhimurium (TA1535, TA1537, TA98 et TA100) et 1 souche d'*Escherichia coli* (WP2 uvrA/pKM101) ont été utilisées. Afin d'optimiser la mise en évidence de mécanismes de pontages ou d'oxydation, il aurait été préférable d'inclure une souche pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN telle que *Salmonella* Typhimurium TA102 ou *Escherichia coli* WP2 ou WP2 pKM101. De plus, la stabilité et l'homogénéité du VA-031 dans le véhicule n'ont pas été déterminées dans le cadre de cette étude, de même que l'analyse de la concentration des solutions de traitement. Cependant, l'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation. Toutes les formulations ont été utilisées dans l'heure qui a suivi l'ajout du véhicule à l'élément d'essai. Cette déviation mineure ne remet pas en cause le statut BPL et l'intégrité de l'étude.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de révertants (dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité des souches bactériennes.

Les résultats montrent une absence d'activité mutagène du dérivé dihydrolysé du TMBPF-DGE (VA-031) dans les 2 essais indépendants effectués sur *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98 et TA100, et sur *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101, avec ou sans activation métabolique exogène.

- Test du micronoyau *in vitro*

Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°487 et dans le respect des principes des BPL.

Sur le plan expérimental, le test du micronoyau a été correctement mené avec deux temps d'exposition dont un temps court avec et sans S9 mix sur des cellules humaines de sang périphérique. Le DMSO et les témoins positifs des cultures ont été utilisés dans les conditions appropriées. Trois concentrations ont été testées avec des cultures dupliquées pour chaque traitement et témoins positifs et quadruplées pour les témoins solvants. La concentration maximale testée est cohérente avec les recommandations de la ligne directrice.

Sur le plan méthodologique, il est précisé que la stabilité et l'homogénéité du VA-031 dans le DMSO n'a pas été vérifiée mais que les solutions ont été préparées extemporanément. Il est aussi précisé que l'analyse de la concentration des solutions de traitement n'a pas été menée dans cette étude. Cependant, l'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation, toutes les formulations ont été utilisées dans les 4h après l'ajout du DMSO à l'élément d'essai. Ces différents points ne remettent donc pas en cause l'intégrité de l'étude.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de cellules binucléées avec des micronoyaux confirmant l'activité du S9 mix et la sensibilité du système d'étude (lymphocytes humains) dans ces conditions expérimentales.

Les résultats ne montrent pas, dans ces conditions expérimentales, de potentiel clastogène/aneugène du dérivé dihydrolysé du TMBPF-DGE (VA-031) sur les lymphocytes humains en culture que ce soit avec ou sans activation métabolique.



Données de génotoxicité sur le TMBPF

Pour répondre à la demande de l'Anses concernant la génotoxicité du TMBPF, le pétitionnaire a fourni en première intention des données issues de prédictions QSAR. Les données toxicologiques disponibles pour le TMBPF dans le dossier du pétitionnaire étaient incomplètes et majoritairement issues de prédictions basées sur les similarités structure/activité. Il n'était donc pas possible de conclure quant au potentiel mutagène et génotoxique du TMBPF aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Ainsi, il a été demandé au pétitionnaire que le TMBPF soit testé expérimentalement au travers de 2 études *in vitro* de génotoxicité : un test de mutation génique sur bactéries et un test du micronoyau *in vitro*. Le pétitionnaire a fourni les tests de génotoxicité demandés ci-dessus.

- Test d'Ames

Sur le plan expérimental, le test d'Ames a été correctement effectué (2 essais indépendants avec et sans S9, plus de 5 doses testées, triplicat/dose, dose maximale testée, intervalle entre les doses d'environ une demi-unité logarithmique). Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°471 et au règlement (CE) n° 440/2008, et effectuée en suivant les BPL.

Sur le plan méthodologique, les 4 souches de *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98, et TA100 et la souche d'*Escherichia coli* WP2 uvrA ont été utilisées. Afin d'optimiser la mise en évidence de mécanismes de pontages ou d'oxydation, il aurait été préférable d'utiliser une souche proficiente en réparation de l'ADN (*Salmonella* Typhimurium TA102 ou *Escherichia coli* WP2 pKM101). De plus, certaines informations sont manquantes (données de stabilité et d'homogénéité de l'élément d'essai dans le véhicule, contrôles des concentrations dans les solutions de traitement). Néanmoins, il est mentionné dans le rapport d'étude que la préparation du TMBPF a été effectuée selon des procédures approuvées et documentées en détail. L'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation et toutes les formulations ont été utilisées dans les 4h suivant l'ajout du véhicule au TMBPF. Cette déviation mineure ne remet pas en cause le statut BPL et l'intégrité de l'étude.

Tous les contrôles positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de révertants (dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité des souches bactériennes.

Les résultats ne montrent aucune augmentation significative de la fréquence des révertants après traitement avec le TMBPF, quelle que soit la souche, en absence ou en présence d'activation métabolique, pour les 2 essais indépendants. Sur la base des résultats de cette étude, le TMBPF est considéré comme non mutagène dans le test de mutation reverse sur *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98 et TA100, et sur *Escherichia coli* WP2 uvrA.

- Test du micronoyau *in vitro*

Cette étude a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE n°487 et dans le respect des principes des BPL.

Sur le plan méthodologique, certaines informations sont manquantes : les données sur la stabilité du TMBPF dans le DMSO, les données d'homogénéité de l'élément d'essai dans le solvant et le contrôle des concentrations dans les solutions de traitement. Cependant, il est mentionné dans le rapport d'étude que la préparation du TMBPF a été effectuée selon des procédures approuvées et documentées en détail. L'homogénéité des formulations a fait l'objet d'une inspection visuelle avant utilisation et toutes les formulations ont été fraîchement préparées et utilisées dans les 2h après la préparation.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de cellules binucléées avec des micronoyaux (dans la plage de distribution des données des valeurs des témoins positifs historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité du système d'essai (lymphocytes humains) dans ces conditions expérimentales. Tous les critères d'acceptabilité sont réunis dans cette étude.

Dans les conditions expérimentales de cette étude, les résultats montrent clairement et de façon statistiquement significative que le TMBPF induit une augmentation, avec un effet dose, des



micronoyaux dans les lymphocytes humains en absence et en présence d'activation métabolique et aux deux temps d'exposition. Le nombre de cellules mono et binucléées contenant des micronoyaux dans les cultures traitées entrent dans la plage de distribution des données des valeurs des témoins positifs historiques du laboratoire. Les critères permettent de conclure au potentiel clastogène/aneugène *in vitro* du TMBPF.

- Test des comètes *in vivo*

L'ensemble des résultats obtenus dans le test des comètes *in vivo* (OCDE 489) réalisé chez le rat Sprague-Dawley mâle exposé par voie orale 3 jours consécutifs à des doses allant jusqu'à et incluant la dose de 2000 mg/kg de poids corporel/jour démontre l'absence de potentiel de fragmentation de l'ADN du TMBPF au niveau du foie et du duodénum. Ces résultats sont en faveur d'une absence de génotoxicité *in vivo* du TMBPF administré par voie orale pour ces 2 organes.

Concernant l'exposition systémique, l'analyse des échantillons de plasma prélevés à 1 h et 3 h après la dernière administration par gavage de rats Sprague-Dawley mâles montre que le TMBPF administré oralement présente des concentrations plasmatiques modérées, entre ~1 et ~2 µg/mL. Ceci démontre néanmoins son passage dans la circulation sanguine et l'exposition systémique des animaux permettant ainsi de garantir que le foie a été réellement exposé.

Les résultats obtenus pour le jéjunum ne peuvent pas être validés mais cela n'impacte pas la conclusion finale puisque l'on dispose de résultats valides pour un organe systémique, *i.e.* le foie, et 2 autres organes du tractus gastro-digestif, l'estomac glandulaire et le duodénum.

Concernant l'estomac glandulaire, une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue accompagnée d'un test de tendance positif a été notée pour le groupe traité à 1000 mg/kg de poids corporel/jour de TMBPF par rapport au groupe témoin négatif. Le pourcentage de la valeur de l'ADN dans la queue correspondante s'est montré très proche de la borne supérieure des données historiques négatives du laboratoire et ce résultat a été considéré comme équivoque dans un premier temps. L'évaluation histo-pathologique de l'estomac glandulaire montre une élimination/perte de cellules épithéliales de la partie fundique et/ou pylorique de l'estomac chez des animaux traités par le TMBPF. Dans les zones affectées, une augmentation d'agrégats de débris cellulaires caractérisée par un cytoplasme hyper éosinophile avec ou sans noyau intact a été notée. En absence d'infiltrat inflammatoire, ces observations suggèrent un effet cytopathique (sub)aigu.

D'après la ligne directrice de l'OCDE 489, lorsque des résultats positifs ou équivoques sont observés uniquement en présence de signes clairs de cytotoxicité, on conclura à une étude équivoque pour ce qui est de la génotoxicité, à moins de disposer d'informations suffisantes pour permettre une conclusion définitive. D'après les informations disponibles, il apparaît probable que des concentrations élevées de TMBPF puissent entraîner une toxicité aiguë au niveau d'un site de contact direct tel que l'estomac glandulaire, ce qui permet de conclure que l'augmentation du pourcentage de fragmentation de l'ADN observée uniquement à la dose intermédiaire est exclusivement dû à l'interférence de la toxicité directe locale du TMBPF. Le TMBPF ne présente donc pas d'activité génotoxique intrinsèque vis-à-vis de l'estomac glandulaire.

En conclusion, ces résultats sont en faveur d'une absence de génotoxicité *in vivo* du TMBPF par voie orale vis-à-vis du foie, de l'estomac glandulaire et du duodénum.

Données de génotoxicité sur les composés à fonction oxirane identifiés

D'après l'expertise des données physico-chimiques, 18 composés à fonction oxirane ont été répertoriés par le GT (12 composés seulement ont été identifiés par le pétitionnaire). Le Niveau d'Exposition Théorique (NET) a été calculé pour chacun d'entre eux.

Conformément à l'avis du CSHPF du 09/12/1997, le NET conditionne le nombre et le type d'études toxicologiques à fournir :

- pour 6 des composés, le NET < 0,5 µg/personne/j : le pétitionnaire doit fournir des données QSAR.



- Pour 11 des composés identifiés, un test de mutation génique sur bactéries et un test du micronoyau sur cellules de mammifères.
- Pour 1 composé, le NET est compris entre 50 et 5000 µg/personne/jour : le pétitionnaire doit fournir 2 tests de génotoxicité *in vitro*, une étude de toxicité subchronique de 90 jours par voie orale avec réversibilité et des données de bioaccumulation chez l'Homme.

Le pétitionnaire n'a fourni des données toxicologiques (cf ci-dessous) que pour le TMBPF-DGE-HQ dont le NET est de 23,66 µg/personne/jour.

Des données toxicologiques sont donc manquantes pour les 17 autres composés. D'après le récent document de l'EFSA relatif à l'évaluation de la génotoxicité des mélanges de produits chimiques³, le GT préconise de suivre les recommandations issues du panel d'experts de l'EFSA : « *If a mixture contains, besides chemically identified substances, a substantial fraction of chemical substances that have not been chemically identified, the Scientific Committee recommends that, first, the chemically identified substances be assessed individually for their potential genotoxicity, using all available information, including read across and QSAR considerations about their genotoxic potential.*

If none of the identified chemical substances in a mixture raises concern for genotoxicity, the genotoxic potential of the unidentified fraction should also be evaluated to complete the assessment of the mixture. Experimental testing of the unidentified fraction should be considered as the first option or, if this is not feasible and a scientific justification is provided, testing of the whole mixture should be undertaken, following the Scientific Committee guidance for individual chemical substances ».

- Test d'Ames

Sur le plan expérimental, le test d'Ames a été correctement effectué selon la ligne directrice OCDE n°471 et en suivant les BPL.

Sur le plan méthodologique, 4 souches de *Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98, et TA100 et la souche d'*Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101 ont été utilisées. Afin d'optimiser la mise en évidence de mécanismes de pontages ou d'oxydation, il aurait été préférable d'inclure une souche pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN telle que *Salmonella* Typhimurium TA102 ou *Escherichia coli* WP2 ou WP2 pKM101. Par ailleurs, aucune analyse de la stabilité de l'élément d'essai dans les formulations ou dilutions testées n'a été effectuée étant donné que les solutions ont été préparées extemporanément et utilisées dans les 3h. Cette déviation mineure ne remet pas en cause le statut BPL et l'intégrité de l'étude.

Tous les contrôles positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de révertants (dans la plage de distribution des valeurs des témoins historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9-mix et la sensibilité des souches bactériennes.

Les résultats ne mettent en évidence aucune augmentation significative de la fréquence des révertants quelle que soit la souche, en absence ou en présence d'activation métabolique. Le TMBPF-DGE-HQ montre donc une absence de potentiel mutagène sur système bactérien (*Salmonella* Typhimurium TA1535, TA1537, TA98 et TA100, et sur *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101).

- Test du micronoyau *in vitro*

Sur le plan expérimental, le test du micronoyau a été correctement mené selon la ligne directrice de l'OCDE n°487 et dans le respect des principes des BPL.

Le test a été effectué avec deux temps d'exposition : un temps court avec et sans activation métabolique (S9 mix) et un temps long sur des lymphocytes humains isolés du sang périphérique avec trois concentrations testées. La concentration maximale testée est cohérente avec les

³ EFSA Journal 2019;17(1):5519, 11pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5519>



recommandations de la ligne directrice 487. Concernant l'analyse de la formulation, Il est précisé que les données sur la stabilité du TMBPF-DGE-HQ en dilution ou dans les solutions ne sont pas fournies mais que les solutions ont été extemporanément préparées le jour de l'expérimentation et utilisées dans les 2h. Ce point ne remet donc pas en cause l'intégrité de l'étude.

Les témoins positifs ont induit des augmentations nettes du nombre de cellules binucléées avec des micronoyaux (les résultats sont dans la plage de distribution des données des valeurs des témoins positifs historiques du laboratoire) confirmant l'activité du S9 mix et la sensibilité du système d'étude (lymphocytes humains) dans ces conditions expérimentales.

Le TMBPF-DGE-HQ, avec les critères d'acceptabilité de l'essai remplis, n'induit pas, quelles que soient les concentrations testées, une augmentation statistiquement significative du nombre de micronoyaux dans les lymphocytes humains en présence ou en absence de S9 mix et dans les conditions utilisées. Les critères permettant de conclure à l'absence de potentiel clastogène/aneugène du TMBPF-DGE-HQ sont remplis.

Conclusions relatives aux données toxicologiques

L'expertise des données concernant la génotoxicité du TMBPF, du TMBPF-DGE, des dérivés dichlorés et dihydrolysés du TMBPF-DGE et du TMBPF-DGE-HQ a été réalisée sur la base des rapports d'études fournis par le pétitionnaire. Ce dernier a fourni les éléments demandés sauf dans le cas des composés à fonction oxirane. L'ensemble des tests a été effectué conformément aux lignes directrices de l'OCDE en vigueur au moment de leur réalisation et en suivant les bonnes pratiques de laboratoire.

Après examen des données par le GT, il apparaît que :

- le TMBPF :
 - ne possède pas d'activité mutagène *in vitro* (test d'Ames) ;
 - possède un potentiel génotoxique *in vitro* (test du micronoyau) ;
 - ne possède pas de potentiel génotoxique *in vivo* (test des comètes *in vivo* avec preuve d'exposition systémique des animaux).
- le TMBPF-DGE :
 - ne possède pas de potentiel génotoxique *in vivo* (test des comètes *in vivo* avec preuve d'exposition systémique des animaux).
- le dérivé dichloré du TMBPF-DGE
 - ne possède pas d'activité mutagène *in vitro* (test d'Ames)
 - ne possède pas de potentiel génotoxique *in vitro* (test du micronoyau)
- le dérivé dihydrolysé du TMBPF-DGE
 - ne possède pas d'activité mutagène *in vitro* (test d'Ames) ;
 - ne possède pas de potentiel génotoxique *in vitro* (test du micronoyau).
- le TMBPF-DGE-HQ
 - ne possède pas d'activité mutagène *in vitro* (test d'Ames) ;
 - ne possède pas de potentiel génotoxique *in vitro* (test du micronoyau).



Concernant les composés à fonction oxirane, 18 oligomères ont été identifiés. Le NET calculé pour chacun d'entre eux indique que des données *in silico* ou *in vitro* et/ou *in vivo* sont nécessaires. Seules des données pour le TMBPF-DGE-HQ ont été fournies par le pétitionnaire. Des données toxicologiques sont donc manquantes pour les 17 autres substances. D'après le récent document de l'EFSA relatif à l'évaluation de la génotoxicité des mélanges de produits chimiques⁴, il est recommandé de mettre en place l'approche suivante « *If a mixture contains, besides chemically identified substances, a substantial fraction of chemical substances that have not been chemically identified, the Scientific Committee recommends that, first, the chemically identified substances be assessed individually for their potential genotoxicity, using all available information, including read across and QSAR considerations about their genotoxic potential.*

If none of the identified chemical substances in a mixture raises concern for genotoxicity, the genotoxic potential of the unidentified fraction should also be evaluated to complete the assessment of the mixture. Experimental testing of the unidentified fraction should be considered as the first option or, if this is not feasible and a scientific justification is provided, testing of the whole mixture should be undertaken, following the Scientific Committee guidance for individual chemical substances ».

Le président propose une étape formelle de validation avec délibération et vote. Il rappelle que chaque expert donne son avis et peut exprimer une position divergente.

Les experts adoptent à l'unanimité les conclusions de l'expertise relative à la demande d'avis scientifique portant sur l'innocuité pour la santé humaine du TMBPF (utilisé comme précurseur) et du TMBPF-DGE (utilisé pour fabriquer une résine de type époxyde au contact des denrées alimentaires, en remplacement du BADGE), et le cas échéant des impuretés, produits de dégradation et oligomères du TMBPF et du TMBPF-DGE (Saisine 2016-SA-0103)

M. le professeur Claude ATGIE, président du GT ESPA

⁴ EFSA Journal 2019;17(1):5519, 11pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5519>