

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 30 septembre 2021

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à un guide d'évaluation du risque sanitaire spécifique aux nanomatériaux dans les produits destinés à l'alimentation

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.
L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.
Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.
Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).
Ses avis sont publiés sur son site internet.*

L'Anses a été saisie le 17 octobre 2016 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL), la Direction générale de la santé (DGS), la Direction générale du travail (DGT), la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF), pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'avis relatif aux nanomatériaux dans les produits destinés à l'alimentation.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Contexte

Dans de nombreux domaines comme celui de l'agroalimentaire, les nanomatériaux manufacturés sont utilisés pour leurs propriétés propres à la nano-échelle (propriétés optiques, mécaniques, etc.) ainsi que pour leur importante surface spécifique. Les nanomatériaux manufacturés peuvent être ajoutés volontairement en tant qu'additifs alimentaires ou en tant qu'additifs technologiques dans la formulation des matériaux au contact des denrées alimentaires.

Les nanomatériaux ne s'inscrivent pas dans une réglementation spécifique, mais sont régis par diverses réglementations sectorielles déjà existantes (CE n°258/97¹, UE n°1169/2011², UE n°10/2011³, etc.). La question de l'harmonisation sur le plan réglementaire fait partie des enjeux et préoccupations soulevés par des organisations de la société civile, principalement des organisations non gouvernementales (ONG), quant aux nanomatériaux en général et dans l'alimentation en particulier.

La coexistence de définitions hétérogènes d'un nanomatériau au sein de ces réglementations sectorielles contribue à entretenir des confusions, notamment par l'interprétation des différents termes employés. Dans ce contexte, le groupe de travail (GT) « nano et alimentation » a établi, dans le cadre de son expertise, une qualification du terme « nanomatériau manufacturé » (partie 3.1) afin de préciser le champ de l'analyse. En préambule et dans l'optique de faciliter la lecture de l'avis, des précisions sont apportées par le GT dans l'encadré ci-dessous.

Dans le cadre de cette saisine, la notion de production intentionnelle fait référence à une production délibérée de particules de taille nanométrique du nanomatériau manufacturé (voir qualification partie 3.1). La notion de production non intentionnelle fait référence à une production non souhaitée de particules de taille nanométrique du nanomatériau manufacturé.

Le GT emploie le terme « d'adjonction volontaire » lorsqu'une substance contenant ou susceptible de contenir des nanomatériaux manufacturés (voir qualification partie 3.1) est ajoutée volontairement et a pour objectif technologique de se retrouver dans les denrées alimentaires. Il emploie le terme d'adjonction involontaire lorsque la présence d'une substance contenant ou susceptible de contenir des nanomatériaux manufacturés n'a pas pour objectif technologique de se retrouver dans les denrées alimentaires.

A titre d'illustration, le E 171⁴ est un additif alimentaire d'adjonction volontaire dans les denrées alimentaires et pour lequel la production de particules de taille nanométrique n'est pas intentionnelle. Le E 551⁵ est un additif alimentaire d'adjonction volontaire dans les aliments et pour lequel la production de particules de taille nanométrique est intentionnelle. Le E 551 est également utilisé en tant qu'auxiliaire technologique lors de la formulation des aliments, dans ce second cas il n'a pas vocation technologique à se retrouver dans les aliments.

Objet de la saisine et périmètre d'étude

Dans ce contexte, le GT « nano et alimentation » a été constitué afin de répondre aux demandes suivantes :

¹ Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires.

² Règlement (UE) n°1169/2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires.

³ Règlement (UE) n°10/2011 de la Commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.

⁴ E 171 : additif alimentaire à base de dioxyde de titane.

⁵ E 551 : additif alimentaire à base de silices amorphes synthétiques.

- 1) Réaliser une étude détaillée de la filière agroalimentaire ;
- 2) Prioriser les substances et/ou produits finis en fonction de critères pertinents ;
- 3) Réaliser une mise à jour des données disponibles (effets toxicologiques et données d'exposition) ;
- 4) Etudier la faisabilité d'une évaluation des risques sanitaires relatifs aux nanomatériaux ;
- 5) Effectuer, au vu des résultats obtenus en 4), une évaluation des risques sur les nanomatériaux priorités.

Afin de répondre à ces demandes, l'Anses a proposé le découpage suivant :

- Phase 1 : réaliser une étude détaillée de la filière agroalimentaire ;
- Phase 2 : mener une analyse des critiques et des contestations relatives à la présence des nanomatériaux dans l'alimentation et des différentes dimensions qu'elles soulèvent (scientifiques, réglementaires, économiques, sociétales) ;
- Phase 3 : considérer la question de l'évaluation des risques portant sur l'exposition aux nanomatériaux manufacturés d'adjonction volontaire contenus dans les produits destinés à l'alimentation humaine identifiés au cours de la Phase 1, en considérant les points suivants :
 - la priorisation des substances et/ou produits finis d'intérêts en fonction de critères pertinents ;
 - la réalisation d'une revue des données disponibles (effets toxicologiques et données d'exposition) relative aux substances préalablement priorités.

Le champ d'investigation de cette saisine s'intéresse uniquement aux nanomatériaux d'adjonction volontaire dans l'alimentation humaine, cela concerne :

- les additifs alimentaires ;
- les substances utilisées dans les matériaux au contact des denrées alimentaires (MCDA) actifs et intelligents et mises volontairement au contact des denrées alimentaires.

Les nanomatériaux manufacturés ajoutés volontairement lors du traitement des matières premières, des aliments ou de l'eau mais n'ayant pas pour objectif technologique de se retrouver dans les denrées alimentaires ne seront pas considérés dans le cadre de ce travail, cela concerne :

- des résidus d'auxiliaires technologiques ;
- des résidus issus de la migration des matériaux au contact des denrées alimentaires (MCDA) autres que les emballages actifs et intelligents et des matériaux au contact de l'eau (MCDE) ;

- des résidus de traitement ou d'adduction des Eaux Destinées à la Consommation Humaine (EDCH) ;
- des résidus de médicaments vétérinaires ;
- des résidus de traitements phytosanitaires ;
- des résidus de produits biocides utilisés comme produits désinfectants ou autres usages ;
- ou encore d'autres nanomatériaux dus (ou liés) à la contamination fortuite de la chaîne alimentaire.

Certains nanomatériaux sont utilisés au sein de compléments alimentaires. Cependant, compte tenu du manque d'information relatif à la nature des nanomatériaux utilisés, des compléments alimentaires concernés et des habitudes de consommation, ces produits n'ont pas été considérés au sein de cette saisine.

L'exclusion de ces nanomatériaux ne présage pas d'une absence de préoccupation sanitaire. Les nanomatériaux présents dans les résidus cités ci-dessus ainsi que ceux utilisés dans les compléments alimentaires pourront faire l'objet d'une évaluation du risque dans le cadre d'une saisine ultérieure.

En 2020, dans le cadre de cette saisine, l'Anses a publié un premier avis⁶ intégrant les conclusions et recommandations du GT nano et alimentation et du CES ERCA relatives aux deux premières phases de l'expertise à savoir : (i) la réalisation d'une étude détaillée de la filière agroalimentaire et (ii) l'analyse des critiques/contestations relatives à la présence des nanomatériaux dans l'alimentation et des différentes dimensions qu'elles soulèvent (scientifiques, réglementaires, économiques, sociétales). Des premiers éléments relatifs à la phase 3, en lien avec la question de l'évaluation des risques portant sur l'exposition aux nanomatériaux manufacturés d'adjonction volontaire, ont également été abordés.

L'objectif du présent avis est de proposer un guide scientifique et technique décrivant la méthodologie à mettre en place dans le cadre de l'évaluation du risque de la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés utilisés en tant qu'additifs alimentaires. L'évaluation du risque relative aux nanomatériaux manufacturés utilisés dans les MCDA n'a pas été considérée dans ce guide du fait de l'utilisation de concepts méthodologiques différents (notamment pour les calculs d'exposition) et du manque de données.

La mise en application de ce guide a des cas concrets de nanomatériaux manufacturés fait l'objet d'un travail d'expertise qui se poursuit, et sera publié ultérieurement dans un avis distinct.

⁶ Nanomatériaux dans les produits destinés à l'alimentation
<https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2016SA0226Ra.pdf>

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques via le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

L'Anses a confié au groupe de travail « nano et alimentation », rattaché aux comités d'experts spécialisés « Evaluation des risques liés aux agents physiques et nouvelles technologies » (CES AP) et « Evaluation des risques physico-chimiques liés aux aliments » (CES ERCA), l'instruction de cette saisine.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis régulièrement aux CES AP et ERCA (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) entre septembre 2017 et mai 2021.

Les travaux du groupe de travail ont été adoptés par le CES ERCA (CES pilote) réuni le 15 avril et le 19 mai 2021.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT NANO ET ALIMENTATION ET DU CES ERCA

3.1. Méthodologie d'évaluation du risque des nanomatériaux proposée par l'EFSA : analyse et commentaires du GT nano et alimentation

L'EFSA a publié en 2018 un guide scientifique et technique (EFSA 2018) proposant une méthodologie globale et séquentielle d'évaluation du risque liée à la présence de nanomatériaux utilisés dans les domaines de l'alimentation humaine et animale, des nouveaux aliments (*Novel Food*), des matériaux au contact des denrées alimentaires et des pesticides. Ce document permet aux pétitionnaires de les guider dans leurs dossiers de demande d'autorisation d'emploi de nanomatériaux. Il permet également aux évaluateurs de les guider dans leur démarche d'évaluation du risque.

Ce guide détaille l'ensemble des éléments relatifs aux notions de définitions des nanomatériaux, de caractérisation physico-chimique, de dissolution, d'exposition, d'identification et de caractérisation du danger devant être considérés pour l'évaluation du risque liée à la présence de nanomatériaux dans la chaîne alimentaire humaine et animale. Les spécificités des nanomatériaux ont été intégrées par le panel d'experts de l'EFSA tout au long de la méthodologie d'évaluation du risque, on parle alors de méthodologie d'évaluation du risque dite « nanospécifique ».

L'approche séquentielle proposée par l'EFSA est illustrée en Figure 1 et s'intéresse aux questions suivantes :

- Le matériau étudié est-il un nanomatériau ?
- Le matériau présente-t-il des propriétés caractéristiques de la nano-échelle ?

- Le nanomatériau est-il présent au sein des denrées alimentaires ?
- Le matériau se dégrade-t-il rapidement dans les conditions du tractus digestif ?
- Le matériau est-il biopersistant ?
- Le matériau présente-t-il des effets néfastes ?

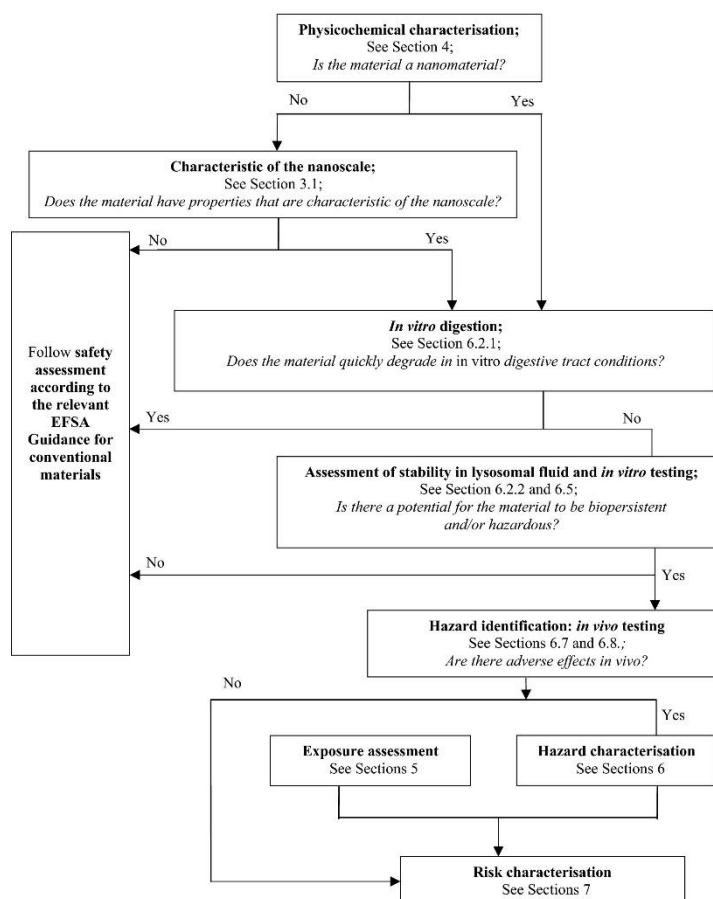


Figure 1. Logigramme proposé par l'EFSA présentant l'approche séquentielle d'évaluation du risque des nanomatériaux⁷.

Commentaires du GT nano et alimentation

Le GT nano et alimentation a expertisé le document guide proposé par l'EFSA et a identifié certaines limitations listées ci-dessous et détaillées dans les parties suivantes.

- Nanomatériaux et définitions considérés dans le cadre d'une évaluation du risque nanospécifique ;

⁷ EFSA 2018. Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health.

- Techniques d'analyses employées pour la mesure de la taille des particules constitutives des nanomatériaux manufacturés ;
 - Détection des nanomatériaux au sein des denrées alimentaires ;
 - Dissolution des nanomatériaux dans les conditions du tractus gastro-intestinal ;
 - Dissolution des nanomatériaux en conditions lysosomales (évaluation de la biopersistance et de l'accumulation intracellulaire des nanomatériaux) ;
 - Etudes toxicologiques considérées dans le cadre d'une évaluation du risque nanospécifique.
- Discussions relatives aux nanomatériaux et définitions considérés dans le cadre des évaluations du risque nanospécifique

Le guide de l'EFSA considère l'ensemble des nanomatériaux décrits ci-dessous:

- les nanomatériaux manufacturés répondant à la définition des règlements sur les *Novel Food* n°2015/2283 et l'information des consommateurs INCO n°1169/2011, *i.e.* les nanomatériaux composés de particules appartenant à la nano-échelle (1-100 nm) (EFSA 2018) ;
- les autres matériaux contenant des particules d'une taille supérieure à 100 nm et présentant des propriétés caractéristiques de la nano-échelle (comme une large surface spécifique ou un comportement toxicocinétique différent par rapport à la forme non nanométrique) devront également être considérés (EFSA 2018) ;
- les matériaux qui ne sont pas manufacturés en tant que nanomatériaux mais qui contiennent une fraction de particules inférieure à 50 % en nombre dans la distribution en taille avec une ou plusieurs dimensions dans la gamme de 1 à 100 nm (EFSA 2018) ;
- les entités nanométriques constituées de matériaux naturels et délibérément produites pour présenter des propriétés nanométriques ou qui ont été modifiées pour le développement d'autres matériaux nanométriques (exemple des composants encapsulés) (EFSA 2018) ;
- les nanomatériaux constitués d'éléments chimiques identiques mais présentant des morphologies, des tailles, des cristallinités ou des propriétés de surface différentes du fait, par exemple, de procédés de fabrication différents (EFSA 2018) ;
- les nanomatériaux répondant à la recommandation (et ses révisions futures) de définition de la Commission européenne (bien que cette recommandation soit en cours de révision) (EFSA 2018).

Comme évoqué dans l'avis de l'Anses de 2020 et rappelé dans ce document, la méthodologie d'évaluation du risque (ERS) proposée par le GT nano et alimentation se limite aux nanomatériaux manufacturés utilisés en tant qu'additifs alimentaires. Dans ce contexte, le GT a établi sa propre qualification du terme nanomatériau manufacturé car les notions d'intentionnalité et de seuil de 50% en nombre de particules, telles que mentionnées dans les

définitions réglementaires, n'ont pas été jugées pertinentes ni compatibles avec les travaux du GT (section 3.2.2). Pour rappel, cette qualification n'a pas de valeur réglementaire.

- Discussions relatives aux techniques analytiques utilisées pour la mesure de la taille des particules constitutives des nanomatériaux manufacturés

La détermination de la taille des particules constitutives est une étape essentielle tout au long de la démarche d'évaluation du risque des nanomatériaux. Elle permet notamment de vérifier si les matériaux étudiés répondent aux critères physico-chimiques utilisés pour les définitions réglementaires ou, dans le cadre de cette saisine, pour la qualification d'un nanomatériau manufacturé proposée par le GT. Les mesures de la taille des particules constitutives sont également essentielles pour le calcul de la fraction massique des particules appartenant à la nano-échelle (section 3.2.4.5) ou encore pour les étapes de regroupement (*grouping*) et de lecture croisée (*read across*) pouvant être utilisés lors de la caractérisation du danger (section 3.2.5.1).

L'EFSA propose l'utilisation de plusieurs techniques indépendantes pour la mesure de la taille, l'une d'elle étant la microscopie électronique. Si l'observation en microscopie électronique n'est pas possible, des techniques alternatives d'imagerie peuvent être utilisées. En complément, d'autres techniques analytiques n'étant pas basées sur l'imagerie telles que la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la sédimentation par centrifugation en phase liquide (CLS) sont également proposées.

Le GT estime que seuls les résultats de mesure de la taille des particules constitutives des nanomatériaux manufacturés obtenus par microscopie électronique doivent être utilisés. En effet, cette technique est celle présentant le moins d'artéfacts de préparation et d'hypothèses dans le traitement des résultats. Elle est donc la plus adaptée et la plus robuste pour déterminer dans l'absolu la taille et la morphologie de ces particules.

Les observations en microscopie électronique permettent également de distinguer les particules isolées de celles engagées au sein d'agrégats et agglomérats⁸. Le GT recommande de coupler systématiquement les observations en microscopie électronique avec de l'analyse dispersive en énergie (EDX⁹) afin de limiter l'observation d'artefacts (ex : nanomatériaux autres que celui d'intérêt).

- Discussion relative à la présence des nanomatériaux dans les denrées alimentaires

Le panel d'experts de l'EFSA aborde la question de la présence des nanomatériaux dans les denrées alimentaires dès les premières étapes de sa méthodologie. Si des nanomatériaux sont observés au sein de matrices alimentaires alors l'évaluation du risque dite « nanospécifique » devra se poursuivre et étudier les phénomènes de dissolution dans les

⁸ Avis Anses 2018-SA-0168. Revue des méthodes analytiques disponibles pour la caractérisation des nano-objets, de leurs agrégats et agglomérats en vue de répondre aux exigences réglementaires

⁹ L'EDX permet d'identifier les éléments chimiques constitutifs des particules observées en microscopie électronique

conditions du tractus gastro-intestinal. Au contraire, si aucun nanomatériau n'est observé au sein des matrices alimentaires alors l'évaluation du risque suivra une approche standard. Si aucune donnée quantitative n'est disponible quant à la concentration en nanomatériau dans les aliments ou aux phénomènes de dissolution, l'EFSA propose d'établir le scénario « pire des cas » à savoir considérer que la totalité des nanomatériaux initialement ajoutés dans les denrées alimentaires sont ingérés puis absorbés sous forme de particules nanométriques.

D'après le GT, la quantification des nanomatériaux dans les denrées alimentaires est une étape indispensable pour les calculs d'exposition (section 3.2.4). Cependant, le GT s'interroge sur la pertinence d'intégrer des études de dissolution et de quantification de nanomatériaux, contraignantes, longues et coûteuses, sur l'ensemble des denrées alimentaires concernées dès les premières étapes de la méthodologie d'évaluation du risque. En effet, d'après le document de l'EFSA, l'aiguillage de l'ERS vers une approche standard ou nanospécifique implique de mesurer les phénomènes de dissolution du nanomatériau considéré. Du fait de la diversité des matrices alimentaires et donc des environnements physico-chimiques différents, une recherche exhaustive des nanomatériaux dans l'ensemble de ces matrices doit être mise en place et les différentes étapes analytiques devront être optimisées en fonction de la nature des denrées alimentaires considérées (section 4.2.4.3). De plus, les nanomatériaux peuvent présenter des phénomènes de dissolution dynamique (ex : le nanomatériau peut se trouver sous forme dissoute dans l'aliment puis à nouveau sous forme particulaire *in vivo* du fait de conditions physico-chimiques différentes). Le GT n'a donc pas intégré dans sa méthodologie les mesures de dissolution dans les denrées alimentaires.

- Discussion relative aux phénomènes de dissolution dans les conditions du tractus gastro-intestinal

Dans son avis de 2020 (ANSES 2020), l'Anses avait analysé la méthodologie proposée par l'EFSA relative aux phénomènes de dissolution. Brièvement, dans le document guide de l'EFSA, le panel d'experts indiquait que si moins de 12%¹⁰ en masse du matériau de départ étaient présents sous forme nanoparticulaire après 30 minutes d'incubation, alors l'évaluation du risque ne nécessitait pas la mise en place d'une approche dite « nanospécifique ». Le GT nano et alimentation avait mis en lumière plusieurs limitations relatives aux paramètres utilisés dans l'élaboration de ce seuil (demi-vie des nanomatériaux, temps de passage de la barrière intestinale, propriétés intrinsèques des nanomatériaux). Du fait de ces limitations, le GT n'a pas retenu le seuil de dissolution proposé dans le guide de l'EFSA. Dans ce contexte, une approche analytique alternative relative à la caractérisation de la dissolution des nanomatériaux avait été proposée par le GT nano et alimentation dans l'avis de l'Anses de 2020¹¹ et rappelée dans la section 3.2.3 de ce document.

¹⁰ Le calcul du seuil de 12% en masse est explicité dans le guide EFSA 2018 (Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health) ainsi que dans l'avis Anses 2020 sur les nanomatériaux dans l'alimentation.

¹¹ <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2016SA0226Ra.pdf>

- Discussion relative aux phénomènes de biopersistance et d'accumulation intracellulaire

L'étude de la biopersistance et de l'accumulation telle que proposée par l'EFSA consiste à mesurer les phénomènes de dissolution des nanomatériaux dans des conditions lysosomales (*i.e.* dans des conditions de pH simulant l'environnement interne des lysosomes). Or, l'absorption des nanomatériaux par les cellules peut passer par différents mécanismes. Parmi ces mécanismes, certains dits « actifs » peuvent aboutir à la formation de lysosomes au sein desquels les conditions acides et la présence d'enzymes favorisent la dégradation/dissolution des nanomatériaux. Ainsi, la mesure de la stabilité des nanomatériaux dans ces conditions permettrait d'évaluer leur persistance et leur accumulation intracellulaire. Au même titre que pour la mesure de la dissolution au sein du tractus gastro-intestinal, un seuil de 12% en masse du matériau de départ après 72h d'incubation a été proposé par l'EFSA. En dessous de ce seuil et en l'absence de toxicité observée via la batterie de tests *in vitro* proposée dans le guide de l'EFSA, la poursuite de l'ERS dite nanospécifique n'est plus nécessaire et une approche standard peut alors être mise en place. Le GT nano et alimentation réitère les limitations évoquées précédemment concernant la méthodologie mise en place pour la détermination du seuil de 12% en masse dans le cadre de la mesure de dissolution au sein du tractus gastro-intestinal. De plus, les phénomènes d'absorption intracellulaire sont des mécanismes complexes et pouvant suivre différentes voies d'internalisation, certaines de ces voies sont schématisées en Figure 2.

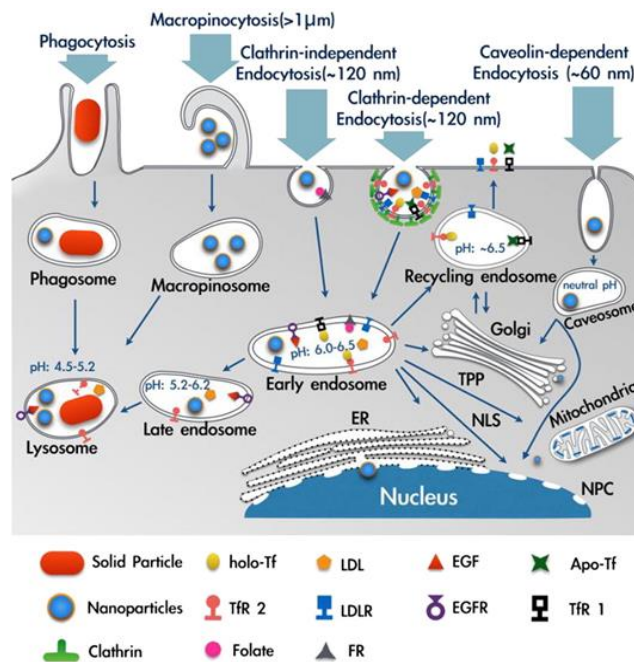


Figure 2. Illustration des différentes voies d'internalisation cellulaire des nanomatériaux. (Yameen *et al.* 2014)

Ces mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés. L'illustration en Figure 2 indique que différentes étapes intermédiaires peuvent exister avant la formation du lysosome. Ces étapes intermédiaires peuvent aiguiller les nanomatériaux vers d'autres organelles de la cellule tels que l'appareil de Golgi, les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou encore le noyau. A titre d'exemples, des études (Slowing *et al.* 2006) ont montré que des nanoparticules de silice internalisées au sein de cellules cancéreuses humaines (HeLa) étaient en mesure de s'échapper des endosomes en fonction de la charge de surface des particules (plus la charge de surface est négative et plus les nanoparticules de silice sont en mesure de s'échapper des endosomes). Enfin, d'autres voies d'absorption n'impliquant pas la formation de lysosomes, telle que la voie paracellulaire, ont également été observées pour le passage de la barrière intestinale (Coméra *et al.* 2020). Ainsi, dans ce contexte, le GT n'a pas retenu cette étape de dissolution au sein des lysosomes et estime que seule la notion de dissolution au sein du tractus gastro-intestinal doit être considérée.

- Discussions relatives aux études toxicologiques considérées dans le cadre d'une évaluation du risque nanospécifique.

De manière globale, les méthodologies d'identification et de caractérisation du danger proposées par l'EFSA et l'Anses sont proches et reposent sur une approche séquentielle (*tiered approach*). Les résultats observés lors des études *in vitro*, de toxicocinétique et sub-chroniques requises vont conditionner la mise en place d'études complémentaires approfondies. Cependant, certaines modifications ont été apportées par le GT. Les principales différences relatives à l'identification et la caractérisation du danger développées par le GT seront explicitées tout au long du document et sont résumées ci-dessous :

- La biopersistence et l'accumulation intracellulaire (dissolution dans les lysosomes) ne sont pas considérées ;
- La recherche des biomarqueurs précancéreux (cellules prénéoplasiques) au niveau du tractus gastro-intestinal est systématiquement mise en place lors de l'étude de toxicité orale à doses répétées de 90 jours ;
- Les études sur le microbiote intestinal ne sont pas considérées.

Pour résumer, certaines étapes proposées au sein du guide de l'EFSA n'ont pas été adoptées par le GT « nano et alimentation » comme évoquées précédemment ainsi que dans l'avis de l'Anses de 2020. Les principaux éléments n'ayant pas été retenus par le GT sont résumés ci-dessous ainsi que dans le tableau en conclusion :

- Le GT n'emploie pas les mêmes définitions que celles utilisées par l'EFSA. En effet, la qualification de « nanomatériau manufacturé » telle que décrite dans ce document est uniquement utilisé par le GT « nano et alimentation » dans le cadre de cette saisine ;
- Les techniques analytiques autres que la microscopie électronique n'ont pas été retenues pour la mesure de la taille des particules constitutives ;

- Les mesures de dissolution des nanomatériaux dans les denrées alimentaires n'ont pas été retenues comme un paramètre à considérer pour la poursuite ou non de l'ERS nanospécifique.
- Les seuils de dissolution proposés par l'EFSA n'ont pas été retenus et des stratégies analytiques alternatives pour la mesure de la dissolution dans les conditions du tractus gastro-intestinal sont proposées ci-après par le GT ;
- Les notions de biopersistance et d'accumulation intracellulaire telles qu'évaluées au travers de la dissolution lysosomale ne sont pas intégrées dans la méthodologie du GT ;
- Des modifications ont été apportées concernant les études à considérer pour l'identification et la caractérisation du danger (voir la conclusion).

La méthodologie d'évaluation du risque nanospécifique proposée par le GT nano et alimentation est présentée de manière séquentielle dans les sections suivantes et résumé en figure 3.

3.2. Méthodologie d'évaluation du risque de la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés proposée par le GT nano et alimentation

3.2.1. Description globale de la méthodologie d'évaluation du risque nanospécifique

L'ERS de la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés repose sur des concepts identiques à ceux mis en place pour l'ERS des substances dites conventionnelles. Les trois fondations de l'évaluation du risque consistent à :

- Caractériser les substances d'intérêt d'un point de vue physico-chimique ;
- Déterminer les niveaux d'exposition des consommateurs à ces substances ;
- Identifier et caractériser le danger de ces substances

Les nanomatériaux présentent des spécificités physico-chimiques particulières qui leur confèrent des propriétés (optiques, mécaniques, etc.) et des comportements (stabilité, adsorption, etc.) différents de ceux observés pour les substances conventionnelles. De plus, les nanomatériaux manufacturés sont constitués de particules présentant une grande hétérogénéité en termes de taille, de morphologie, de cristallinité, etc.

Idéalement, l'ERS devrait être menée spécifiquement sur chacune des particules constitutives du nanomatériau étudié. Cependant, cette approche n'est pas réalisable sur un plan scientifique et technologique. Les nanomatériaux doivent donc être considérés comme des mélanges complexes au sein desquels des tentatives de regroupement de particules (*grouping*) et de lecture croisée (*read across*) peuvent être mises en place pour mener à bien l'évaluation du risque du consommateur exposé à ces nanomatériaux manufacturés (section 3.2.5).

Les spécificités des nanomatériaux ont été intégrées à différentes étapes de la méthodologie d'évaluation du risque proposée au sein de ce document que ce soit pour l'élaboration de la qualification d'un nanomatériau manufacturé, lors des étapes de caractérisation de la dissolution, de la détermination de l'exposition ou des études toxicologiques à considérer. La Figure 3 illustre les principales étapes de cette méthodologie dite « nanospécifique ». Ces étapes doivent être abordées de manière séquentielle :

- Etape 1 : Le matériau étudié répond-il à la qualification d'un nanomatériau manufacturé ?
- Etape 2 : Le nanomatériau est-il entièrement dissout dans les conditions du tractus gastro-intestinal ?
- Etape 3 :
 - a : Quels sont les niveaux d'exposition des consommateurs à la fraction nanométrique du nanomatériau manufacturé ?
 - b : Quels sont les effets toxicologiques de la fraction nanométrique du nanomatériau manufacturé ?
- Etape 4 : Les données relatives à la caractérisation du danger et aux niveaux d'exposition sont-elles suffisantes pour mener la caractérisation du risque ? Si oui, la fraction nanométrique du nanomatériau manufacturé présente-t-elle un risque ?

L'ensemble de ces étapes sont décrites dans les sections ci-dessous.

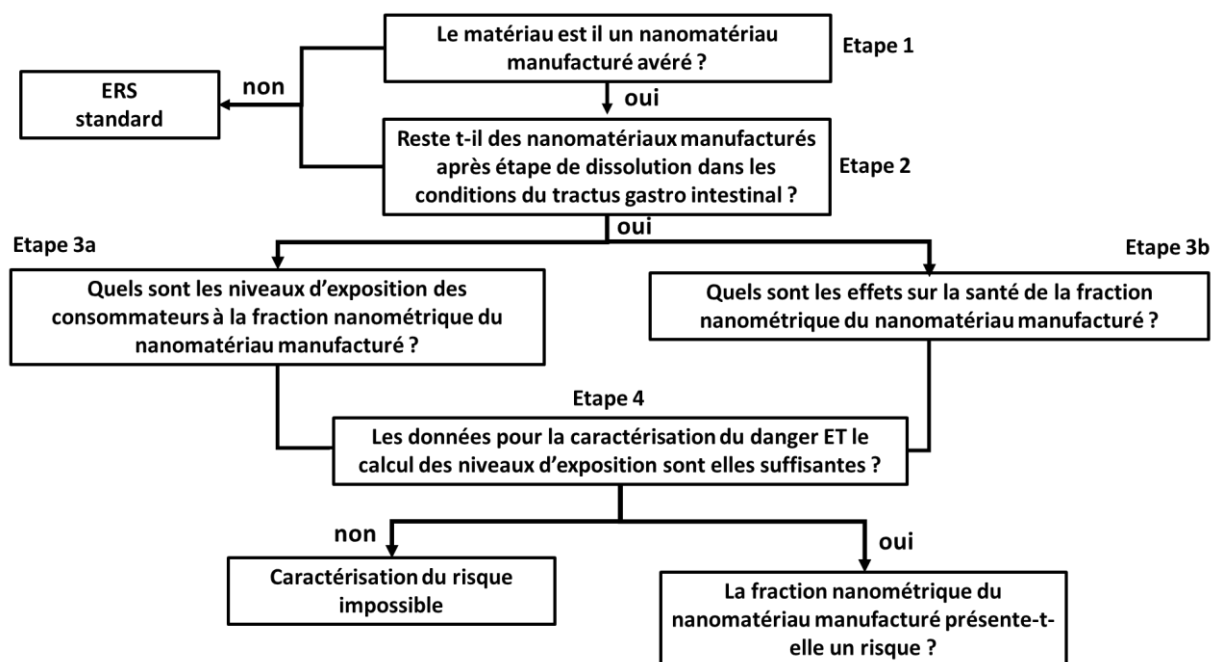


Figure 3. Logigramme présentant la méthodologie globale d'évaluation du risque nanospécifique développée par le GT nano et alimentation. Des précisions sur les étapes de calcul d'exposition et de caractérisation du danger sont indiquées dans les Figure 6 et Figure 9.

3.2.2. Etape 1 : le matériau répond-t-il à la qualification de nanomatériau manufacturé ?

Méthodologie

La première étape consiste à déterminer si le matériau étudié correspond à un nanomatériau avéré, *i.e.* s'il répond à la qualification du terme nanomatériau manufacturé proposée par le GT et rappelée ci-dessous.

Nanomatériau manufacturé : matériau de nature organique, inorganique ou composite, produit par l'Homme à des fins applicatives et composé en tout ou partie de particules constitutives présentant au moins une dimension comprise entre 1 et 100 nm (nano-échelle).
Les dimensions des particules constitutives peuvent être supérieures à 100 nm si ces dernières présentent une surface spécifique importante ou des propriétés propres à la nano-échelle.
Les particules constitutives peuvent se retrouver sous la forme d'agrégats ou d'agglomérats dont les dimensions peuvent être largement supérieures à la nano-échelle.
Les matériaux pour lesquels la fraction nanométrique n'aurait pas été produite intentionnellement au cours des processus de fabrication rentrent dans le cadre de cette qualification.

Les détails relatifs à l'élaboration de cette qualification sont précisés dans l'avis de l'Anses de 2020 (ANSES 2020) relatif à la première phase de l'expertise de cette saisine. Les principaux éléments sont rappelés brièvement ci-dessous.

Le GT a décidé de ne pas tenir compte du seuil de 50 % en nombre de particules tel qu'il est mentionné dans la recommandation de définition de la Commission européenne¹². Ce seuil ne repose sur aucune considération sanitaire, analytique ou technologique.

Plusieurs techniques sont actuellement utilisées, notamment par les laboratoires officiels de contrôle, pour mettre en évidence la présence des nanomatériaux telles que la microscopie électronique (transmission ou balayage), la diffusion dynamique de la lumière (DLS), le comptage individuel de particules par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (sp-ICP-MS) ou encore par fractionnement d'écoulement de champ (A4F). Le GT estime que la microscopie électronique est actuellement la technique la mieux adaptée et la plus robuste pour la mesure de la taille des particules constitutives.

A composition chimique identique, certaines propriétés et comportements de la matière à l'échelle nanométrique peuvent être fondamentalement différents de ceux du même composé de taille supérieure ou sous forme moléculaire. Les propriétés propres à la nano-échelle sont associées à une grande surface spécifique par rapport aux formes non nanométriques (et donc potentiellement à une grande réactivité chimique ou biologique) ainsi qu'à des propriétés physiques ou chimiques particulières (propriétés mécaniques, optiques, etc.).

La microscopie électronique, considérée par le GT comme étant la technique la mieux adaptée et la plus robuste pour la mesure de la taille des particules, peut être considérée comme une

¹² Recommandation (2011/696/UE) de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux.

technique semi quantitative (estimation du nombre de particules de taille nanométrique ≤ 100 nm). De plus, différentes observations en microscopie électronique ont montré que les nanomatériaux utilisés comme additifs alimentaires sont souvent observés sous la forme d'agrégats/agglomérats. Ce phénomène peut être lié aux procédés de fabrication de produits alimentaires, à la nature physico-chimique des nanomatériaux et aux protocoles de préparation de l'échantillon avant l'observation en microscopie électronique. Ainsi, une limite de détection analytique ne peut pas être établie par le GT.

Cependant, afin de limiter les difficultés d'interprétation des résultats obtenus en microscopie électronique, le GT propose de mettre en place la procédure suivante. Les observations en microscopie électronique devront être effectuées à partir de 3 préparations indépendantes issues d'un même lot du matériau étudié. Pour chaque préparation, les opérateurs devront mesurer la taille des particules à partir d'une population allant de 100 particules (a minima) à 300¹³ particules observées sur une dizaine de champs microscopiques (choisis de manière aléatoire sur la totalité de la surface de la préparation), permettant d'assurer une meilleure représentativité. Toutes les particules observables (avec des contours bien définis) dans chacun des champs d'observation devront être mesurées. A l'issue de cette analyse, si au moins 1 particule appartenant à la nano-échelle, à l'état libre ou engagée dans un agrégat/agglomérat est observée sur chacune des 3 préparations, alors le matériau répond à la qualification de nanomatériau manufacturé. En cas contraire, le matériau ne sera pas considéré comme un nanomatériau selon la qualification proposée par le GT.

Afin de limiter les ambiguïtés d'interprétation, notamment pour les échantillons constitués d'une faible fraction nanométrique, un témoin négatif consistant à observer en ME uniquement le milieu de dispersion (i.e. sans le matériau étudié) permettra de mettre en évidence d'éventuelles contaminations de l'échantillon (nanomatériaux présents dans l'air, les instruments de laboratoire, etc.). L'association de l'EDX avec les observations en ME permet de s'assurer que les objets observés sont constitués du même élément chimique que le matériau étudié. Le GT recommande, dans le cas d'une observation au ME à balayage, d'utiliser la procédure de spin coating telle que décrite en section 3.2.4.5 pour la préparation des échantillons.

Décisions

Si le matériau étudié ne correspond pas à la qualification établie par le GT, alors l'évaluation du risque suivra une approche standard. Dans le cas où le matériau est identifié comme étant un nanomatériau manufacturé selon la qualification établie par le GT, alors l'étape 2 sera suivie.

¹³ Au-delà d'une population de 300 particules, les distributions granulométriques sont faiblement impactées lorsque le nombre de particules considérées augmente.

3.2.3. Etape 2 : reste-t-il des nanomatériaux manufacturés après étape de dissolution dans les conditions du tractus gastro intestinal ?

L'étape 2 consiste à déterminer si des nanomatériaux manufacturés sont encore présents après une étape de dissolution au sein de simulants du tube digestif. L'étude d'Avramescu *et al.* (2017) s'est intéressée à l'influence de paramètres tels que le pH, la température et la forme cristalline sur le comportement de solubilisation de nanomatériaux inorganiques. Dans cette étude, deux matériaux ont été testés : ZnO et TiO₂. Pour ces deux composés étudiés, et dans les deux conditions de pH (1,5 et 7), les essais ont montré que, quelle que soit la condition de pH, la capacité des analogues non nanométriques du ZnO et du TiO₂ à résister aux altérations chimiques/biochimiques était égale ou supérieure à celle des nanomatériaux correspondants. Les résultats ont également montré que la taille des particules et la forme cristalline des nanomatériaux inorganiques sont des propriétés importantes qui influencent le comportement de dissolution et la biodurabilité. Enfin, tous les nanomatériaux et analogues non nanométriques ont présenté une solubilité significativement plus élevée à pH acide (par rapport au pH neutre).

Des modèles de digestion *in vitro* ont déjà fait l'objet de publications¹⁴. Les conditions opératoires utilisées au sein de ces modèles reflètent, avec différents degrés de complexité, les conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal. Ainsi, des études de digestion ont été menées à partir de ces modèles sur certains nanomatériaux (Ag, SiO₂, ZnO) et publiées dans le projet NANoREG (livrable D5.02).

Au vu de l'absence de tests standardisés et de la diversité des nanomatériaux manufacturés, le GT n'est pas en mesure, à l'heure actuelle, de proposer des protocoles détaillés, fixant précisément tous les paramètres physico-chimiques à considérer et transposables à l'ensemble des nanomatériaux identifiés dans le cadre de cette saisine. Le GT propose au sein de cet avis des stratégies analytiques et liste les facteurs qui requièrent des points de vigilance tels que les paramètres intrinsèques aux nanomatériaux (taille, nature chimique, *etc.*) et les conditions expérimentales (nature du milieu, force ionique, concentration initiale en (nano)matériaux, *etc.*).

Ainsi, les stratégies analytiques proposées par le GT devront être adaptées aux spécificités de chaque nanomatériau manufacturé et le choix des conditions expérimentales mises en place par les opérateurs devra être argumenté.

Afin d'étudier les phénomènes de dissolution des nanomatériaux, le GT propose deux approches. En première intention, le GT préconise de suivre la stratégie 1 (détaillée dans le paragraphe suivant) simple à mettre en œuvre et permettant d'obtenir une réponse rapide sur la présence des nanomatériaux manufacturés après l'étape de dissolution. En cas de résultat négatif, et afin de limiter le nombre de conclusions de type faux négatifs, la stratégie 2 (détaillée dans le paragraphe suivant) devra être appliquée.

¹⁴ Report on the development of a solubility testing procedure, NANoREG, 2015.

Méthodologie de la stratégie 1

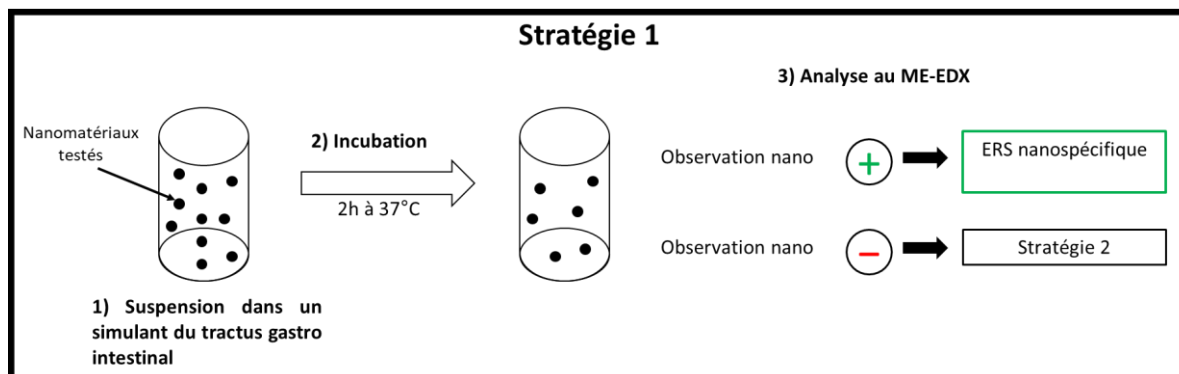


Figure 4. Schéma analytique de la stratégie 1 permettant de répondre à la question relative à la dissolution des nanomatériaux manufacturés. ME : microscopie électronique, EDX : analyse dispersive en énergie, ERS : évaluation du risque sanitaire.

1) Les nanomatériaux sont mis en suspension dans un simulant de milieu biologique. Dans un contexte d'évaluation du risque par voie orale, le GT préconise d'étudier la dissolution des nanomatériaux au sein de simulants du tractus gastro-intestinal. Du fait de l'absence de conditions opératoires standardisées, le GT laisse le choix aux opérateurs de fixer la composition du milieu dispersant. Cependant, la composition des milieux devra être clairement décrite et les choix argumentés. Afin d'exposer les nanomatériaux aux variations de pH observées le long de l'appareil digestif, les nanomatériaux seront mis en suspension dans deux simulants : l'un à pH 1 et l'autre à pH 7, ces deux valeurs de pH représentant les valeurs extrêmes observées de l'estomac à l'intestin. Les niveaux de concentration des nanomatériaux mis en suspension devront être suffisamment élevés pour permettre une observation au microscope électronique (balayage ou transmission). Cependant, les concentrations maximales ne devront pas atteindre celles pour lesquelles les phénomènes de sédimentation des particules sont observés. En effet, le GT estime que les phénomènes de sédimentation suite à la perte du caractère dispersé des particules constitutives, peuvent influencer les phénomènes de dissolution. Les choix des concentrations retenues devront donc être argumentés.

2) L'incubation se déroule sous agitation à 37°C pendant 2h.

3) Immédiatement après l'étape d'incubation (2h), l'observation au microscope électronique (balayage ou transmission) permet de mettre en évidence la présence de particules résiduelles. L'observation au microscope électronique doit être systématiquement couplée à de la spectrométrie à dispersion d'énergie (EDX) afin d'exclure les artéfacts qui ne correspondraient pas au nanomatériau étudié.

Le GT préconise d'éviter les temps de latence entre chaque étape afin de limiter la sédimentation des particules.

Décisions

Si des nanomatériaux sont observés au microscope électronique couplé à l'EDX (ME-EDX) après l'étape de dissolution, alors l'évaluation du risque suivra une approche dite nanospécifique. En l'absence de nanomatériaux lors de l'observation au ME-EDX alors la stratégie 2, intégrant une étape de préconcentration, devra être mise en place. Cette étape pourrait faciliter la détection de nanomatériaux initialement présents à de faibles niveaux de concentration. Les critères de décision analytique en ME sont identiques à ceux décrits en section 3.2.2.

Méthodologie de la stratégie 2

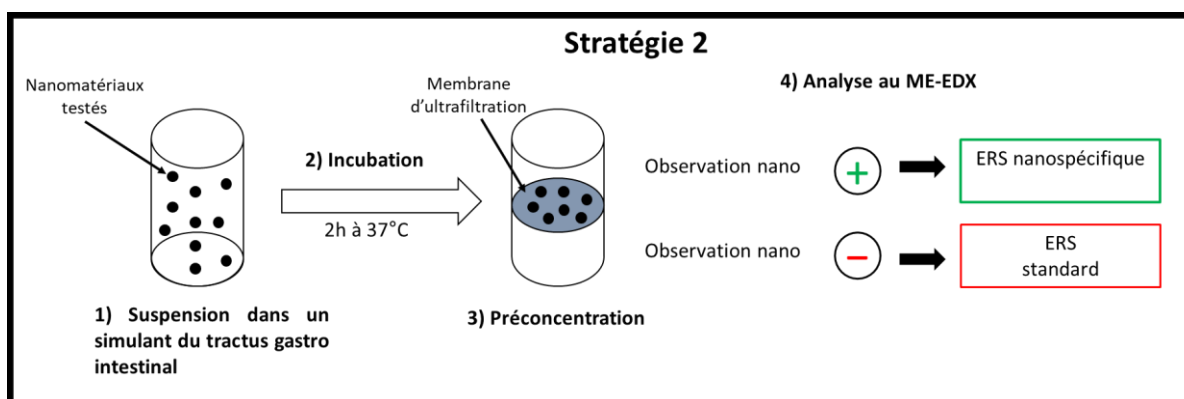


Figure 5. Schéma analytique de la stratégie 2 permettant de répondre à la question relative à la dissolution des nanomatériaux manufacturés. ME : microscopie électronique, EDX : analyse dispersive en énergie, ERS : évaluation du risque sanitaire.

Les étapes de mise en suspension et d'incubation sont identiques à la stratégie 1. Suite à l'étape d'incubation, une étape de préconcentration sur membrane (*via* une technique d'ultrafiltration) est mise en place dans le cas où des nanomatériaux ne seraient pas observés à l'issue de la stratégie 1. Afin d'évaluer les performances de cette étape, les facteurs de préconcentration devront être déterminés et clairement indiqués.

L'opérateur devra s'assurer que la taille des pores de la membrane d'ultrafiltration (exprimée le plus souvent en équivalent dalton) est adaptée aux propriétés physico-chimiques du nanomatériau notamment dans l'optique de retenir les plus petites particules constituant la fraction nanométrique du matériau initial. D'autres techniques de préconcentration telles que l'ultracentrifugation et la dialyse sont également disponibles. Dans le cas de l'ultracentrifugation, les paramètres expérimentaux peuvent être difficiles à fixer, les temps de centrifugation peuvent être importants et le culot constitué de particules peut diffuser vers le surnageant. La dialyse, bien que simple à mettre en œuvre, repose sur des temps de diffusion importants. Dans ce contexte, les techniques d'ultrafiltration apparaissent comme étant les plus rapides, les plus efficaces et les plus simples à mettre en œuvre.

Dans le cas où des nanomatériaux ne seraient pas observés dans le retentât de la membrane de filtration, les opérateurs devront s'assurer que les substances, présentes sous forme particulaire avant l'étape d'incubation, se retrouvent sous forme dissoute au niveau du filtrat. Cette étape permet de s'assurer que les particules ne sont pas adsorbées à la paroi des tubes ou piégées dans la membrane de filtration (ces particules ne sont plus accessibles pour les analyses). Pour cela, des techniques d'ICP-MS peuvent être utilisées.

Décisions

Si des nanomatériaux sont observés au ME-EDX après l'étape de dissolution et de pré-concentration alors l'évaluation du risque suivra une approche « nanospécifique ». En l'absence de nanomatériaux lors de l'observation au ME-EDX alors l'évaluation du risque suivra une approche standard. Les critères de décision analytique en ME sont identiques à ceux décrits en section 3.2.2.

3.2.4. Etape 3a : quels sont les niveaux d'exposition des consommateurs à la fraction nanométrique du nanomatériau manufacturé

3.2.4.1. Préambule

Comme mentionné dans le cadrage de cette saisine, la méthodologie d'ERS développée par le GT nano et alimentation porte exclusivement sur les nanomatériaux manufacturés utilisés comme additifs alimentaires. Ainsi, les méthodologies présentées dans ce document se focalisent sur les calculs d'exposition par voie orale des consommateurs aux nanomatériaux manufacturés utilisés comme additifs alimentaires. Pour rappel, les nanomatériaux manufacturés utilisés comme additifs alimentaires sont des mélanges complexes de particules polydispersées et constitués partiellement (cas du E 171) ou intégralement (cas du E 551) de particules constitutives appartenant à la nano-échelle.

Ainsi, le GT propose de déterminer dans un premier temps les niveaux d'exposition des consommateurs au nanomatériau manufacturé dans son ensemble (*i.e.* à l'additif alimentaire correspondant) puis dans un second temps de déterminer, à partir des niveaux d'exposition au nanomatériau manufacturé préalablement calculés, le niveau d'exposition des consommateurs à la fraction nanométrique (*i.e.* aux particules constitutives appartenant à la nano-échelle (1-100 nm)) du nanomatériau manufacturé. Ces étapes sont schématisées en Figure 6. La combinaison des données de consommation avec les données de concentration des additifs alimentaires dans les matrices alimentaires est réalisée à l'aide de l'outil Food Additives Intake Model (FAIM, des détails sont fournis dans les sections suivantes) et permet de calculer les niveaux d'exposition aux additifs alimentaires et donc, dans le cadre de cette saisine, aux nanomatériaux manufacturés. Les calculs des niveaux d'exposition à la fraction nanométrique consistent à multiplier le niveau d'exposition des consommateurs au nanomatériau manufacturé par le pourcentage massique de particules constitutives appartenant à la nano-échelle. Les précisions de ces calculs sont exposées ci-dessous.

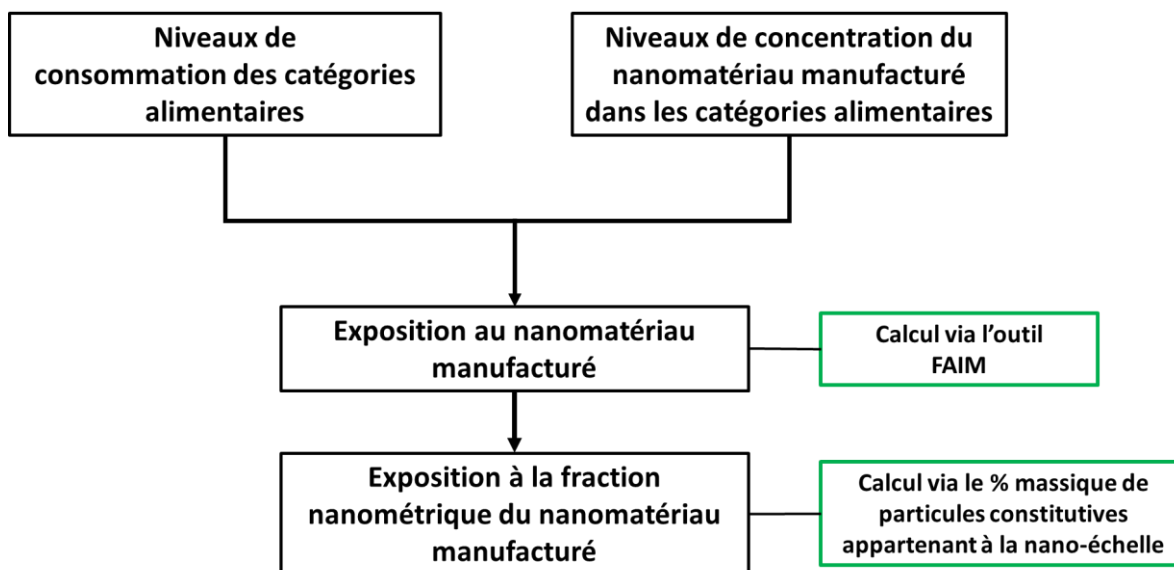


Figure 6. Méthodologie relative aux calculs d'exposition des consommateurs aux nanomatériaux manufacturés et à leur fraction nanométrique. Les cases vertes indiquent les modèles et méthodes de calcul utilisés.

3.2.4.2. Niveaux de consommation

Les travaux du GT se concentrent uniquement sur les expositions des consommateurs à l'échelle nationale. Les niveaux de consommation de la population française considérés dans le logiciel FAIM sont ceux issus de l'étude INCA2 (données de consommation collectées en 2006 et 2007)¹⁵. Les niveaux de consommation pour chacune des catégories alimentaires considérées dans le logiciel FAIM sont indiqués, dans le cas de la France, pour 4 classes d'âges :

- Enfants (3-10 ans)
- Adolescents (11-17 ans)
- Adultes (18-64 ans)
- Personnes âgées (65 ans et plus)

Au cours de la première phase de son expertise, le GT a identifié l'ensemble des catégories alimentaires pouvant contenir des nanomatériaux manufacturés. Parmi ces catégories, certaines concernent une catégorie d'âge particulière à savoir la population infantile. Ainsi, dans l'optique de déterminer les niveaux d'exposition pour les enfants de moins de 3 ans, les calculs d'exposition devront se baser sur les niveaux de consommation de l'étude « BEBE-SFAE » 2005, étude TNS-Sofres-CHU Dijon réalisée pour le Syndicat Français des Aliments

¹⁵ Etude individuelle Nationale sur les Consommations Alimentaires : <https://www.anses.fr/fr/content/inca-2-les-r%C3%A9sultats-dune-grande-%C3%A9tude>

de l'Enfance (Fantino et Gourmet 2008) telle que précisée au sein de l'étude de l'alimentation totale infantile publiée par l'Anses en 2016¹⁶.

3.2.4.3. Niveaux de concentration

- Catégories alimentaires concernées

En première intention, le GT recommande de collecter les données de concentration des nanomatériaux manufacturés pour l'ensemble des catégories alimentaires référencées au sein de l'outil FAIM. En effet, au cours de son expertise, le GT a pu identifier que certains nanomatériaux, notamment le E 171, étaient à la fois présents dans les catégories alimentaires pour lesquelles son usage est autorisé mais également au sein de catégories alimentaires pour lesquelles son usage n'est pas autorisé. La présence de nanomatériaux manufacturés au sein de catégories alimentaires n'étant pas censées en contenir pourrait s'expliquer par le phénomène de « carry over¹⁷ ».

- Sources de données

Au cours de ces travaux, le GT a pu identifier deux sources de données principales :

- les niveaux d'usage rapportés par l'industrie. Ces niveaux représentent des quantités d'incorporation d'additifs alimentaires utilisés lors de la formulation des denrées alimentaires. Ces données ont été publiées au sein de différents travaux menés par l'EFSA¹⁸ et le RIVM¹⁹ notamment.
- les données analytiques provenant de l'analyse de produits alimentaires. De nombreuses publications scientifiques se sont intéressées à l'extraction et la quantification de nanomatériaux au sein de différentes matrices alimentaires. Ces données peuvent également provenir d'organismes de contrôle (DGCCRF) ou de la littérature grise (exemple d'analyses menées par des ONG).

Le GT estime que les données de concentration des nanomatériaux manufacturés, qu'elles soient sous la forme de niveaux d'usage ou issues de données analytiques, doivent être considérées avec le même degré d'importance. Le GT souligne également que, dans le cas où les niveaux de concentration sont déterminés à partir de différentes sources de données et que le nombre de données issu de ces sources est hétérogène, alors les données de concentration devront être pondérées (un exemple est proposé en note de bas de page²⁰).

¹⁶ <https://www.anses.fr/fr/content/etude-de-l%E2%80%99alimentation-totale-infantile>

¹⁷ Phénomène de transfert (« carry over ») : l'additif alimentaire est apporté dans l'aliment final par d'autres ingrédients et n'apparaît pas systématiquement dans la liste des ingrédients du produit fini.

¹⁸ Re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive : <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4545>

¹⁹ Sprong, C., *et al.*, Exposure assessment of the food additive titanium dioxide (E 171) based on use levels provided by the industry. RIVM letter report 2015-0195, 2016.

²⁰ Du fait de l'hétérogénéité du nombre de données provenant de la source x et y, une moyenne pondérée des concentrations en nanomatériau (NM) par catégorie alimentaire est calculée.

- Extraction et préparation de l'extrait avant caractérisation

Les caractérisations physico-chimiques (morphologie, distribution granulométrique, *etc.*) des nanomatériaux manufacturés utilisés au sein des aliments nécessitent au préalable de les extraire des matrices alimentaires. Ces dernières présentent des propriétés physico-chimiques différentes pouvant influencer sur les protocoles d'extraction. A titre d'exemple, une extraction de E 171 à partir d'un gâteau de type cake peut s'effectuer en milieu aqueux alors que l'extraction du même additif au sein d'un chewing-gum nécessite un protocole d'extraction plus complexe impliquant l'usage d'azote liquide. Le GT souligne que les protocoles d'extraction ne doivent pas introduire de modifications de la distribution granulométrique initiale de l'échantillon. Cette modification pourrait résulter d'une extraction sélective selon la taille des particules.

De manière générale, le protocole d'extraction des nanomatériaux d'une matrice alimentaire combine les étapes suivantes:

- dans le cas de matrices alimentaires complexes, une première étape de digestion chimique destinée à augmenter l'accessibilité aux nanomatériaux et améliorer le taux de récupération est mise en place ;
- puis des lavages répétés au moyen de différents solvants choisis en fonction de la matrice alimentaire et de la nature des particules à extraire sont effectués afin d'éliminer les résidus de matrices alimentaires encore présents. Une étape de lavage consiste à centrifuger la suspension contenant les particules, à retirer ensuite le liquide surnageant et à le remplacer par un solvant propre ;
- enfin, l'application d'ultrasons à la suspension lavée permet de dissocier au maximum les agglomérats/agrégats de particules potentiellement présents afin de pouvoir accéder à la taille des particules constitutives de façon fiable.

- Quantification des nanomatériaux dans les denrées alimentaires

Différentes techniques quantitatives peuvent être utilisées afin de déterminer des niveaux de concentration de nanomatériaux manufacturés (dans le cadre de cette saisine, les nanomatériaux manufacturés considérés correspondent à des additifs alimentaires) au sein des matrices alimentaires. Cette quantification de l'additif alimentaire ne nécessite pas de distinguer sous quelle forme (particulaire, moléculaire ou ionique) se trouve le nanomatériau. Pour cela, des techniques telles que l'ICP-MS, l'ICP-HRMS, l'ICP-OES, la sp-ICP-MS ou la spectrophotométrie UV peuvent être utilisées. L'utilisation de ces techniques quantitatives ne permet pas, à l'exception de la sp-ICP-MS, de distinguer les formes particulaires des formes moléculaires ou ioniques. La quantification de l'additif (exemple : E 551) via ces techniques repose sur la quantification de l'élément chimique (exemple : silicium). Cette approche peut entraîner une surestimation de la concentration de l'additif alimentaire car la présence de l'élément quantifié dans les denrées alimentaires peut être d'origine naturelle.

$$[\text{NM}]_{\text{catégorie alimentaire}} = (a[\text{NM}]_x + b[\text{NM}]_y) / (a+b)$$

Avec $[\text{NM}]_{\text{catégorie alimentaire}}$ la concentration moyenne de nanomatériau manufacturé par catégorie alimentaire, a le nombre de données provenant de la source x, b le nombre de données provenant de la source y et $[\text{NM}]_x$ et $[\text{NM}]_y$ les concentrations moyennes en nanomatériau manufacturé issues des données des sources x et y respectivement.

En revanche, les calculs d'exposition à la fraction nanométrique du nanomatériau nécessitent l'utilisation de techniques analytiques permettant la caractérisation des formes particulières, la mesure de leur taille ainsi que la détermination de la granulométrie. Selon le GT, la microscopie électronique est la seule technique adaptée à ce jour à ce type de mesure (plus de détails seront apportés dans les sections suivantes).

3.2.4.4. Calcul d'exposition aux nanomatériaux manufacturés (additifs alimentaires)

Comme mentionné précédemment, les calculs d'exposition des consommateurs aux nanomatériaux manufacturés reposent sur l'utilisation du logiciel FAIM. Cet outil permet aux pétitionnaires, aux évaluateurs de risque ou aux gestionnaires du risque d'estimer l'exposition moyenne et élevée (95^{ème} centile) aux additifs alimentaires pour différentes classes d'âge dans plusieurs pays européens.

Les données d'occurrence des additifs alimentaires sont renseignées pour chacune des catégories alimentaires et les niveaux de consommation individuels, collectés auprès des États membres de l'UE (base de données exhaustive de l'EFSA sur la consommation alimentaire européenne) sont utilisés pour le calcul des expositions.

L'exposition des consommateurs est calculée en multipliant, pour chaque catégorie alimentaire, les concentrations du nanomatériau par les niveaux de consommation de chaque individu référencé dans la base de données. Les expositions calculées pour chacune des catégories alimentaires sont additionnées afin d'estimer une exposition totale journalière de chaque individu. Ces expositions totales journalières pour chaque individu sont moyennées sur le nombre de jours d'enquête. Les enquêtes alimentaires effectuées sur un seul jour sont exclues car non représentatives d'expositions répétées. Cette approche permet d'obtenir des distributions d'expositions totales journalières individuelles et de calculer une valeur moyenne et un 95^{ème} centile d'exposition totale journalière pour chaque classe d'âge considérée.

L'outil FAIM permet de calculer, dans le cas de la France, les niveaux d'exposition aux additifs alimentaires pour 4 classes d'âges : les enfants (3 à 10 ans), les adolescents (11 à 17 ans), les adultes (18 à 64 ans) et les personnes âgées (65 ans et plus).

3.2.4.5. Calcul d'exposition à la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés

Comme évoqué en préambule, le calcul d'exposition des consommateurs à la fraction nanométrique du nanomatériau manufacturé considéré repose sur la détermination, au sein de ce nanomatériau, de la fraction massique de particules constitutives appartenant à la nano-échelle (1-100 nm).

- Sources de données et échantillonnage

La détermination de la fraction massique de particules constitutives appartenant à la nano-échelle peut s'effectuer directement sur le nanomatériau avant son intégration dans les formulations alimentaires. Cette approche permet de déterminer une fraction massique maximale du matériau brut car ce dernier n'est pas soumis aux conditions physico-chimiques des denrées alimentaires pouvant potentiellement, dans certains cas, entraîner des phénomènes de dissolution des particules.

La seconde approche consiste à déterminer la fraction massique à partir de nanomatériaux extraits des matrices alimentaires. Cette approche nécessite d'extraire les nanomatériaux de différentes catégories alimentaires dans l'optique de considérer la variabilité des conditions physico-chimiques observées dans les différentes matrices alimentaires (voir protocole d'extraction dans les sections précédentes). Le GT préconise la mise en place de cette seconde approche qui est plus représentative des fractions massiques auxquelles les consommateurs peuvent être exposés.

- Préparation et observation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon est une étape importante permettant de faciliter l'étape d'observation des particules en microscopie électronique. Dans cette optique, le laboratoire national de métrologie et d'essai (LNE) a développé une méthode permettant de déposer les particules sur un substrat après étalement d'une goutte de la suspension contenant les particules en une fine couche. Cette approche permet également de limiter les phénomènes d'agrégation/agglomération des particules lors du dépôt.

Brièvement, les particules sont mises en suspension à un pH défini par leurs propriétés physico-chimiques puis déposées sur un substrat de silicium. Ce dernier est soumis à un gradient de vitesse par rotation permettant une diffusion radiale et isotrope du liquide à la surface du substrat de silicium *via* la technique de spin coating. Cette méthode permet d'obtenir une distribution homogène et monocouche des particules avant leur observation.

Les forces centrifuges mises en œuvre permettent au liquide de s'étaler à la surface du substrat de silicium et l'excédent de liquide est expulsé hors du substrat. Les temps (30 s) et les vitesses (maximum à 8000 rpm) de rotation appliqués ne sont pas suffisants pour obtenir une séparation des particules en fonction de leur taille. Ainsi, les proportions de particules avant et après rotation ne sont pas modifiées du fait de la perte de liquide liée aux forces centrifuges.

Les études ont montré que le pH de la suspension déposée peut influencer la qualité de la dispersion des particules. En effet, le substrat de silicium possède généralement une charge de surface négative et les particules ont une charge de surface dépendante de la valeur du pH de la suspension, leur charge de surface étant neutre au pH correspondant au point isoélectrique des particules²¹. Ainsi, si les particules et le substrat de silicium ont des charges de surface de même signe, l'adhésion des particules à la surface du substrat sera faible et peu de particules pourront être observées en ME. De plus, si le pH est proche du point

²¹ Si le pH > point isoélectrique (pI) alors les particules seront chargées négativement. Si pH < pI alors les particules seront chargées positivement.

isoélectrique, alors la charge de surface des particules sera insuffisante en valeur absolue pour assurer la répulsion électrostatique entre les particules, ces dernières auront alors tendance à s'agglomérer lors du dépôt entraînant ainsi des difficultés d'observation et de mesure de la taille des particules constitutives en ME. La Figure 7 illustre l'influence du pH dans le cas du E 171. La dispersion plus efficace des particules à pH 2 peut s'expliquer par le fait que le point isoélectrique du E 171 est d'environ 4. A pH 2, la charge de surface des particules est positive et la répulsion électrostatique entre les particules limite la formation d'agrégats/agglomérats. A pH 6 la charge de surface des particules est globalement négative, cependant la répulsion électrostatique n'est pas suffisante pour repousser les particules les unes par rapport aux autres favorisant ainsi leur agrégation/agglomération.

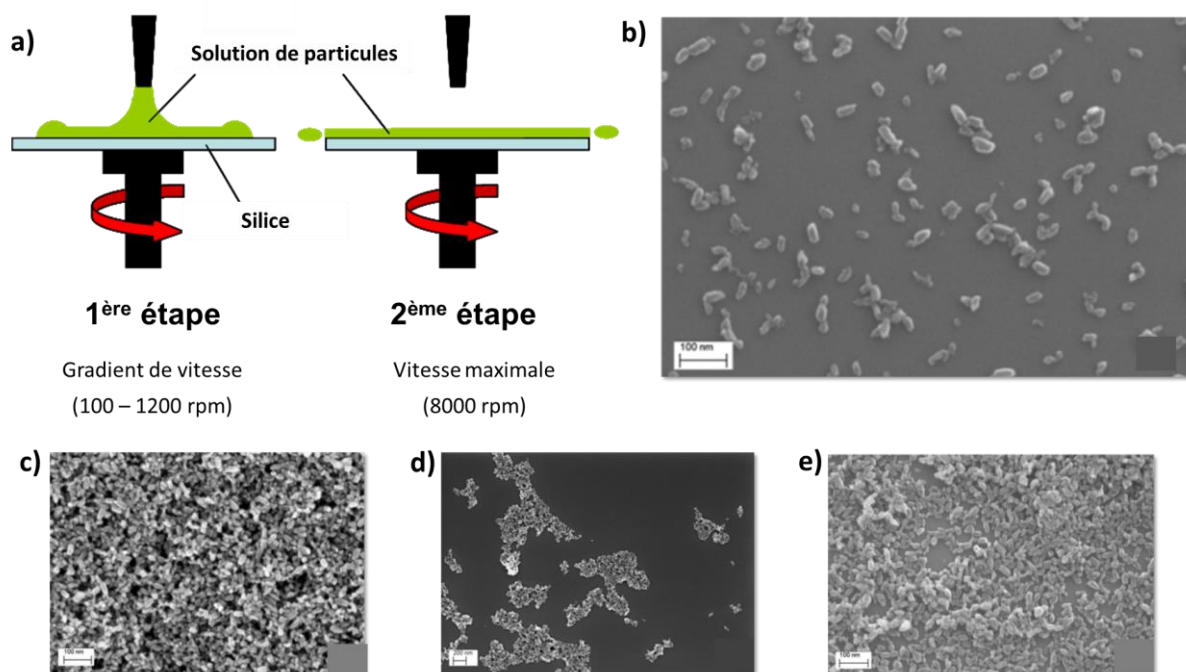


Figure 7. a) Schéma illustrant la technique de spin coating. Une goutte de solution contenant les particules en suspension est déposée puis étalée de manière homogène à la surface d'un substrat de silicium via l'application d'un gradient de vitesse par rotation. b) Observation de particules de E 171 à la surface du substrat de silicium après application de la technique de spin coating à pH 2. Résultats obtenus pour des particules de E 171 à pH 6 sans spin coating (c), à pH 6 avec spin coating (d) à pH 2 sans spin coating (e).

L'approche développée par le LNE n'est pas standardisée mais offre une stratégie analytique intéressante en vue de préparer les échantillons avant leur observation car elle est facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. Certaines données utilisées par le GT dans le cadre de la détermination de la fraction nanométrique du E 171 reposent sur cette technique de préparation (résultats actuellement non publiés). Les conditions opératoires devront être optimisées en considérant les propriétés physico-chimiques des nanomatériaux (notamment la charge et la chimie de surface). Cette technique a été validée via des mesures faites sur des particules de références (JRC) et via des inter-comparaisons avec des opérateurs

n'utilisant pas le dépôt en spin coating. Les protocoles de cette technique sont précisés dans l'étude de Ghomrasni *et al.* (2020).

- Modèle et calculs

La première étape consiste à déterminer la distribution granulométrique en masse du nanomatériau manufacturé considéré. Pour cela, 2 paramètres peuvent être mesurés : la surface de la particule ou le diamètre de Féret (Figure 8). Dans les deux cas, la détermination de ces paramètres passe par l'observation des échantillons en microscopie électronique (balayage ou transmission).

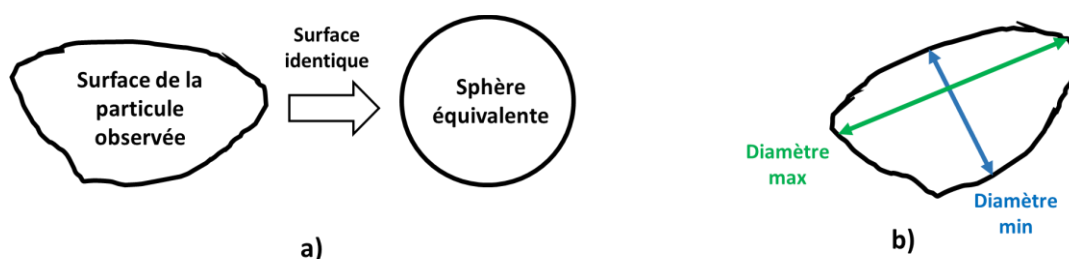


Figure 8. Détermination de la fraction massique des particules appartenant à la nano-échelle par la mesure a) de la sphère équivalente ou b) du diamètre de Féret.

- Mesure de la surface

Les particules constitutives des nanomatériaux ne présentent généralement pas de formes parfaitement sphériques, mais elles sont souvent assimilées à des sphères, on parle alors de sphéroïdes. Ainsi la première étape consiste à mesurer la surface des particules observées en microscopie électronique. Le disque présentant une surface identique à celle mesurée est ensuite considéré pour déterminer le diamètre du disque équivalent puis le volume de la sphère équivalente. En considérant la densité moyenne du nanomatériau manufacturé considéré, la masse de chaque particule au sein de l'échantillon observé peut alors être déterminée. Ainsi, la contribution massique des particules constitutives appartenant à la nano-échelle peut être calculée.

- Mesure du diamètre de Féret

Comme évoqué précédemment, la plupart des particules constitutives des nanomatériaux présente des anisotropies morphologiques. Comme illustré en Figure 8, des diamètres de Féret minimum et maximum peuvent être mesurés pour chaque particule. Le GT estime que la plus petite dimension de chaque particule doit être considérée pour la détermination de la distribution granulométrique et préconise donc la mesure du diamètre de Féret minimum. A partir de ce diamètre, et en supposant que la particule soit sphérique, le volume de la sphère puis sa masse pourraient être calculés comme explicité dans le paragraphe précédent.

Le GT estime que la mesure du diamètre de Féret minimum est l'approche la plus adaptée pour déterminer le nombre de particules appartenant à la nano-échelle, *i.e* plus adaptée pour déterminer le nombre de particules dont au moins une dimension est inférieure à 100 nm. En

effet, la considération de la plus petite dimension permet de maximiser le nombre de particules appartenant à la nano-échelle.

Néanmoins, l'utilisation du diamètre de Féret minimum entraîne une sous-estimation du volume et donc de la masse des particules. Ce biais est exacerbé dans le cas des particules présentant une forte anisotropie (exemple des oxydes de fer).

Idéalement, le GT préconise d'utiliser dans un premier temps la mesure du diamètre de Féret pour déterminer la population de particules appartenant à la nano-échelle puis dans un second temps la mesure de la surface des particules pour estimer leur masse.

- Détermination du niveau d'exposition à la fraction nanométrique

Les niveaux d'exposition des consommateurs à la fraction nanométrique du nanomatériau manufacturé (E_{FN}) considéré sont issus du produit des niveaux d'exposition au nanomatériau manufacturé (E_{NM}) par la contribution (pourcentage) massique moyenne ou maximale (selon le scénario d'exposition considéré) de la fraction nanométrique du nanomatériau manufacturé ($\%_{FN}$).

$$E_{FN} = E_{NM} \times \%_{FN}$$

3.2.5. Etape 3b : quels sont les effets sur la santé de la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés

3.2.5.1. Préambule

L'identification et la caractérisation du danger de la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés reposent sur une approche séquentielle schématisée en Figure 9.

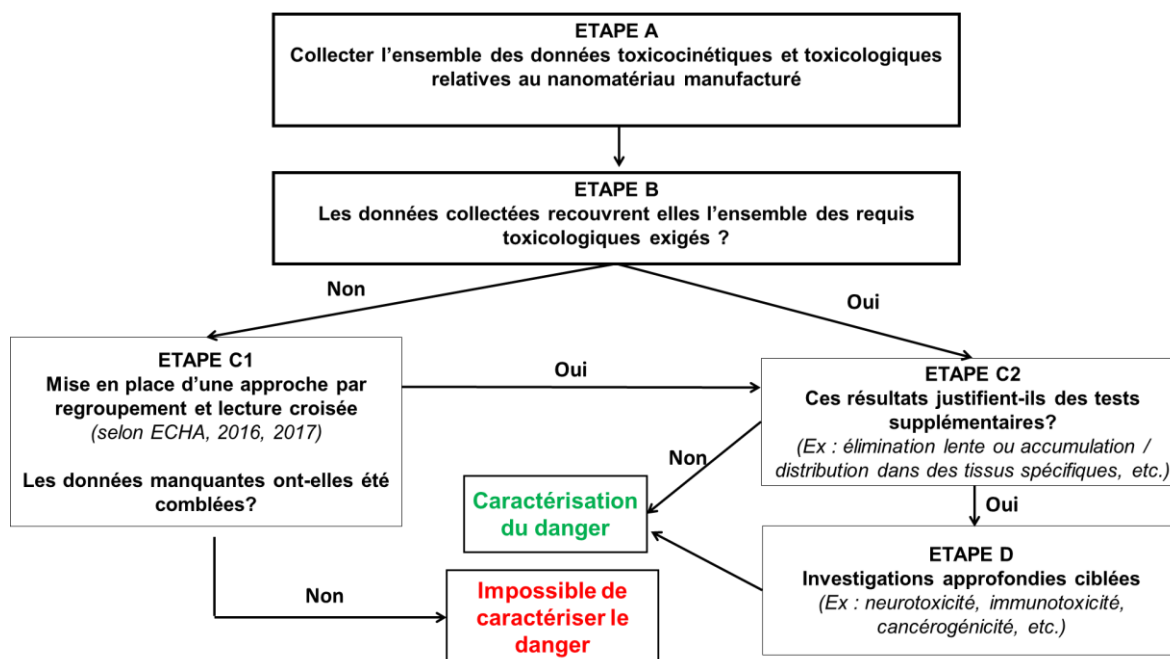


Figure 9. Méthodologie séquentielle de l'évaluation et la caractérisation du danger de la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés.

- **Etape A : collecter l'ensemble des données toxicocinétiques et toxicologiques relatives au nanomatériau manufacturé**

Cette étape consiste à collecter l'ensemble des données toxicocinétiques et toxicologiques *in vitro*, *in vivo* et *in silico* (i.e. études prédictives utilisant des approches QSAR, PBTK, etc.) relatives à la fraction nanométrique du nanomatériau manufacturé étudié. Si disponibles, les études épidémiologiques doivent également être considérées. La collecte des données peut intégrer des publications scientifiques ainsi que des rapports d'études générés par les industriels. Les études sélectionnées doivent présenter des critères de qualité notamment concernant la caractérisation physico-chimique des nanomatériaux étudiés (cristallinité, taille, granulométrie). Les études toxicologiques sélectionnées doivent *a minima* intégrer la taille moyenne des particules utilisées. Comme mentionné précédemment dans ce document ainsi que dans l'avis de l'Anses publié en 2020, le GT estime que la microscopie électronique est actuellement la technique la mieux adaptée et la plus robuste pour mesurer la taille des particules constitutives. Les informations relatives à la caractérisation physico-chimique sont importantes notamment dans une optique de regroupement/lecture croisée (Etape C).

Les données toxicologiques obtenues à partir du nanomatériau manufacturé dans son ensemble peuvent également être considérées. Ces études devront intégrer *a minima* les critères de sélection suivants :

- mesure de la taille moyenne des particules constitutives
- fraction nanométrique en nombre et/ou en masse.

La taille et la distribution granulométrique des nanomatériaux sont des paramètres essentiels dans le cadre d'une ERS nanospécifique. D'autres paramètres physico-chimiques tels que la présence d'impuretés, la morphologie, la charge et la chimie de surface, la cristallinité, la surface spécifique et la porosité devront également être considérés. Les méthodes analytiques adaptées à l'étude de ces paramètres sont décrites dans le guide de l'EFSA²².

Enfin, la collecte de données devra, en plus d'intégrer les études basées sur les formes nanoparticulaires du nanomatériau manufacturé, intégrer les formes ionique et/ou moléculaire de l'élément correspondant (ex : l'ion Ag⁺ dans le cas des nanomatériaux à base d'argent).

Le GT souligne que si la forme ionique et/ou moléculaire du nanomatériau considéré montre des effets toxicologiques, alors l'étude de ces effets à partir des formes nanoparticulaires doit être systématique.

- **Etape B : les données collectées recouvrent elles l'ensemble des données toxicologiques requises ?**

Cette étape consiste en l'analyse des données collectées afin d'évaluer si ces dernières couvrent l'ensemble des études toxicologiques requises (section 3.2.5.3)

Décisions : Dans le cas où les données toxicologiques requises ne sont pas couvertes, alors l'approche par regroupement et lecture croisée sera mise en place au cours de l'étape C1. Dans le cas contraire, l'étape C2 sera mise en place.

- **Etape C1 : mise en place d'une approche par regroupement et lecture croisée**

La variabilité des propriétés physicochimiques des nanomatériaux donne lieu à une grande variété de matériaux qui peuvent présenter des comportements biocinétiques, des dangers et donc des risques potentiellement différents. Pour limiter la quantité de tests nécessaires à l'évaluation des risques ou pour tenter de combler des informations biocinétiques et toxicologiques non disponibles, les approches de regroupement (grouping) et de lecture croisée (read-across) peuvent être utilisées (Oomen *et al.* 2015).

De manière générale, des substances peuvent être regroupées selon leurs propriétés : physicochimiques, toxicologiques, écotoxicologiques et/ou leur devenir dans l'environnement et dans l'organisme humain. Ces propriétés sont susceptibles d'être comparables. Au sein d'un groupe de substances, un manque de données peut être comblé en utilisant l'approche dite de lecture croisée (« read-across »). Cette méthode permet de prédire des informations relatives à un paramètre biologique et/ou biocinétique donné pour une substance à évaluer (substance cible), en utilisant les

²² EFSA 2018 : guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health.

données du même paramètre décrites pour une ou plusieurs autres substances du même groupe (*i.e.*, substance(s) source(s)), et ce sans avoir à procéder à de nouvelles expérimentations. Lorsqu'elle est envisagée, la lecture croisée doit être réalisée indépendamment pour chaque paramètre biologique et/ou biocinétique. Ces approches de regroupement et de lecture croisée offrent une meilleure utilisation des informations disponibles et permettent de définir la nécessité de générer ou non des données supplémentaires pour un paramètre biologique spécifique.

Différents concepts de regroupement et de lecture croisée ont été proposés par les chercheurs et ont été récemment examinés par Lamon *et al.* (2018). Jusqu'à présent ces concepts se sont concentrés principalement sur les aspects de santé et de sécurité au travail, avec un point focal sur les évaluations des dangers, la contrepartie environnementale étant toujours en cours de développement (Wigger et Nowack, 2019). Dans ce contexte, un guide sur le regroupement des nanomatériaux proposé par l'ECHA a récemment été développé sous la forme d'une annexe au chapitre R.6 de REACH (Annexe R.6-1 de l'ECHA, 2019)²³. Ce document vise à fournir une approche systématique et pragmatique permettant au final de mettre en évidence d'éventuelles différences relatives aux propriétés toxicologiques et au devenir des nanomatériaux²⁴. L'approche est séquentielle, les nanomatériaux sont regroupés sur la base de paramètres physico-chimiques pertinents (qui peuvent varier en fonction du critère d'évaluation considéré). L'application de cette stratégie permettra de déterminer s'il existe des données de dangers et/ou de comportements biocinétiques disponibles pour les nanomatériaux et si ces données sont applicables au(x) groupe(s) formé(s). Il est important de s'assurer de l'applicabilité et de la pertinence de toutes les données disponibles sur les dangers des nanoformes (ou ensembles de nanoformes) existantes.

La démonstration que le regroupement des nanomatériaux et la lecture croisée entre le nanomatériau source et les nanomatériaux cibles sont robustes et justifiés est indispensable pour l'exploitation des résultats. Afin de faciliter la collecte des données et la documentation systématique et transparente du regroupement et de l'approche par lecture croisée, il est recommandé de suivre une approche par étapes (voir la Figure 10) pour chaque paramètre biologique et biocinétique destiné à être couvert par l'approche.

²³ ECHA. Reference: ECHA-17-G-17-EN. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Appendix R.6-1 for nanomaterials applicable to the Guidance on QSARs and Grouping of Chemicals Version 2.0 December 2019.

²⁴ L'ECHA utilise le terme de nanoforme

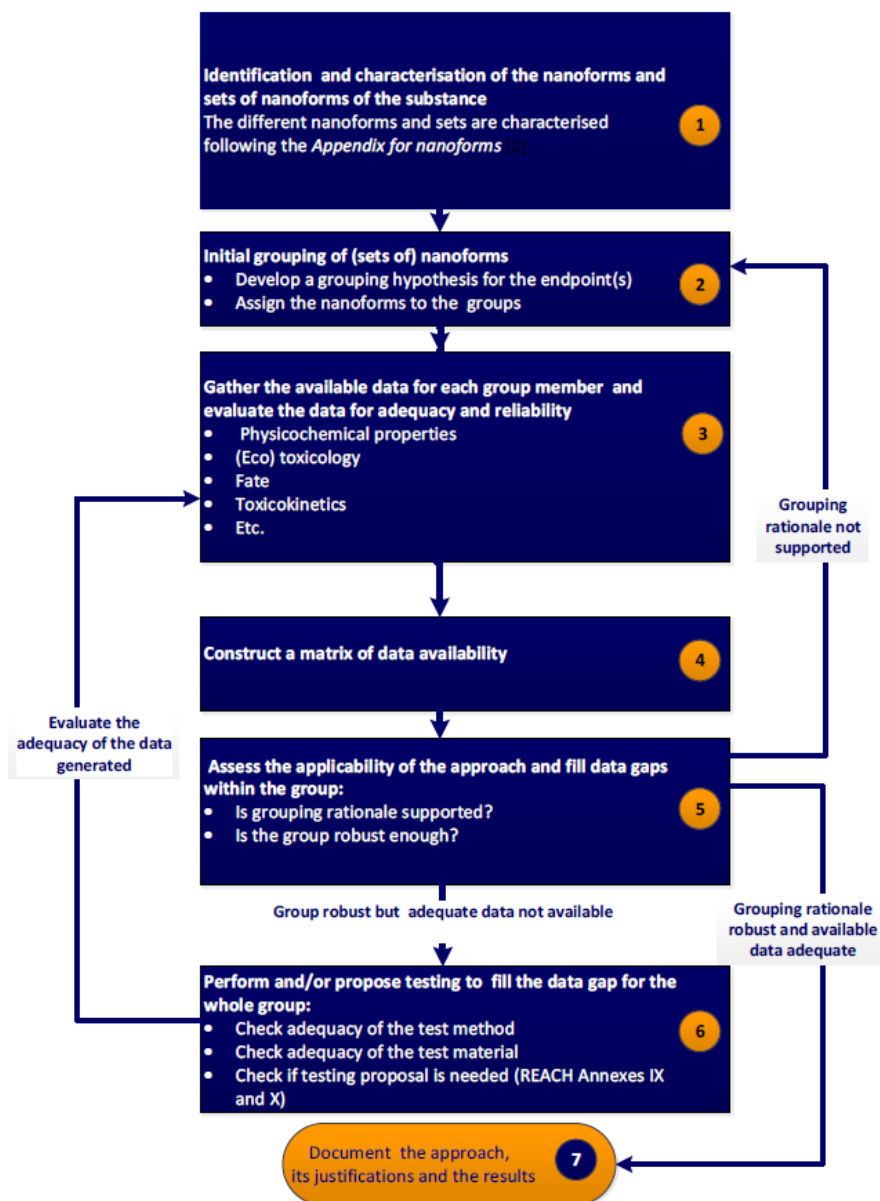


Figure 10. Schéma de l'approche par étapes du regroupement/lecture croisée (extrait de ECHA-17-G-17-EN).

Le document Annexe R.6-1 de l'ECHA a été appliqué pour une étude de cas sur le regroupement et la lecture croisée visant spécifiquement la génotoxicité du nano-TiO₂ (OCDE, 2018)²⁵. Le but de cet exercice de lecture croisée était de déterminer le potentiel génotoxique de deux formes cristallines du nano-TiO₂ (nano-TiO₂ rutile et anatase) sur la base des résultats du test des comètes *in vitro* obtenus à partir de différentes nanoparticules de TiO₂ (les nano-TiO₂ NM100 à NM105).

Le JRC a également suivi les orientations du document Annexe R.6-1 de l'ECHA pour l'évaluation de nanotubes de carbone en matière de génotoxicité (Aschberger *et al.*

²⁵ ENV/JM/MONO(2018)28. 21 September 2018

2019). Notamment, les méthodes de regroupement et de lecture croisée ont été appliquées à 19 types de nanotubes de carbone à parois multiples afin de combler le manque de données sur la génotoxicité.

Ainsi, afin de combler un manque de données d'un nanomatériau à évaluer, le GT recommande, en première intention, d'utiliser les approches de regroupement/lecture croisée telles que décrites dans le document Annexe R.6-1 de l'ECHA (2019).

Décisions : Si les données manquantes n'ont pas été comblées par le regroupement / lecture croisée alors l'ERS ne peut pas être finalisée. Dans le cas où les données ont été comblées, l'étape C2 sera mise en place.

- **Etape C2 : les résultats justifient-ils des tests complémentaires ?**

L'analyse des résultats issus des études toxicologiques requises conditionne la mise en place éventuelle d'études toxicologiques complémentaires (section 3.2.5.4)

Décisions : Si les résultats des études toxicologiques requises montrent des effets nécessitant d'être approfondis, alors des études complémentaires ciblées devront être mises en œuvre lors de l'étape D. Exemple : des tests de génotoxicité *in vitro* positifs conditionnent la mise en place d'études de génotoxicité complémentaires *in vitro et/ou in vivo*.

Si les études complémentaires ne sont pas nécessaires alors la caractérisation du risque peut être menée.

- **Etape D : investigations approfondies ciblées**

Après analyse des données générées lors des études complémentaires, la caractérisation du risque peut être menée.

3.2.5.2. Modifications et/ou adaptations méthodologiques lors de l'évaluation toxicologique des nanomatériaux manufacturés

Les étapes clés de l'évaluation toxicologique des nanomatériaux manufacturés sont : la caractérisation physico-chimique, les méthodes de préparation (protocole de dispersion), le choix et l'argumentation du(des) systèmes d'essai mis en œuvre et des conditions expérimentales associées, ainsi que la prise en compte des biais et des interférences possibles. Il est donc nécessaire d'apporter des modifications et/ou d'adapter les méthodologies mises en œuvre dans le cadre de l'évaluation toxicologique des nanomatériaux manufacturés.

- **Méthode de préparation des nanomatériaux manufacturés : protocole de dispersion**

Pour étudier les effets toxicologiques *in vitro* ou *in vivo* de nanomatériaux manufacturés, un protocole de dispersion doit être mis en œuvre afin d'identifier certains dangers associés à l'état nanoparticulaire. La dispersion idéale peut être décrite comme l'état dans lequel les particules sont complètement séparées les unes des autres et où il n'existe pas d'agglomérats/agrégats (Sager *et al.* 2007). Ainsi, la mise en place d'une étape de dispersion pourrait permettre d'identifier certains effets associés à des usages d'un nanomatériau en tant qu'additif alimentaire. Cependant, elle peut aussi apparaître comme peu représentative d'un additif alimentaire tel que présent dans les aliments. Dans ces conditions, il peut s'avérer utile de comparer les éventuels effets observés d'un nanomatériau dispersé d'une part ou ajouté directement à une matrice alimentaire d'autre part.

Le protocole de dispersion, quel qu'il soit, peut directement influencer sur la qualité et la stabilité de la suspension nanoparticulaire préparée. Par exemple, Donaldson (2010) a constaté qu'un nanomatériau est très mal dispersé dans de l'eau pure et forme des agglomérats, ce qui n'est pas le cas lorsque des protéines, formant une corona²⁶ à la surface des particules, sont ajoutées.

Le protocole choisi pour la dispersion, y compris l'ajout de composés comme des dispersants ou des protéines, est connu pour influencer les caractéristiques physico-chimiques des suspensions de nanoparticules et donc possiblement le résultat des essais. Par exemple, selon Magdolenova *et al.* (2012), une suspension de nano-TiO₂ dispersée par sonication pendant 3 min dans un milieu initial sans sérum (obtention d'agglomérats de grandes tailles) a induit des dommages à l'ADN dans trois lignées cellulaires, tandis que les mêmes nano-TiO₂ dispersées en présence de sérum dans la solution mère après 15 min de sonication (obtention d'agglomérats de moins de 200 nm) n'ont eu aucun effet en termes de génotoxicité. Ainsi, l'utilisation de différentes procédures pour préparer des dispersions d'un même nanomatériau peut être une source directe de variation de la toxicité ou de l'écotoxicité mesurée (Hartmann *et al.* 2015). C'est pourquoi il est important, lors de l'évaluation du danger associé aux nanomatériaux manufacturés, d'établir des procédures d'essai standardisées.

Ces considérations techniques ont été abordées récemment dans le cadre du projet Nanoreg (Oomen *et al.* 2015). Des guides de l'Agence européenne des produits chimiques (Lamon 2019 et Henning 2019) et des lignes directrices sur la préparation des nanomatériaux et la dosimétrie ont été publiées par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE).

Dans le cadre de projets européens portant sur l'étude de la toxicologie de nanomatériaux, des protocoles standards ont été proposés^{27,28}. Néanmoins, ces protocoles se limitent souvent

²⁶ Couronne constituée de protéines et d'autres éléments qui se fixent à la surface du nanomatériau. Sa composition dépend du milieu dans lequel le NM est dispersé. La corona obtenue lors de la préparation d'une suspension nanoparticulaire utilisée dans un test *in vitro* sera donc très différente de celle produite lors un test *in vivo*. De plus, elle sera différente *in vivo*, en fonction de la voie d'entrée, selon que ce soit par exemple la peau ou les poumons.

²⁷ Final protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media. The generic NANOGENOTOX dispersion protocol. 2011. https://www.anses.fr/en/system/files/nanogenotox_deliverable_5.pdf

²⁸ F Caputo, J Clogston, L Calzolari, M Rösslein, A Prina-Mello. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. Control Release. 2019 Apr 10;299:31-43.

à la caractérisation des nanomatériaux dans les solutions de dispersion et abordent peu les questions posées après l'ajout des nanomatériaux dans les milieux de culture cellulaire ou de traitement (distribution, corona, stabilité, sédimentation). Récemment, Kaur *et al.* (2017, Figure 11) ont proposé un protocole par étapes pour la dispersion des nanomatériaux dans les milieux aqueux. Ce protocole qui s'appuie sur une caractérisation physico-chimique en temps réel a permis d'identifier les conditions optimales de sonication (intensité et durée), dans l'optique d'améliorer la stabilité et l'homogénéité des suspensions de nanoparticules sans incidence sur l'intégrité de l'échantillon (absence de modification, pas de dégradation du nanomatériau).

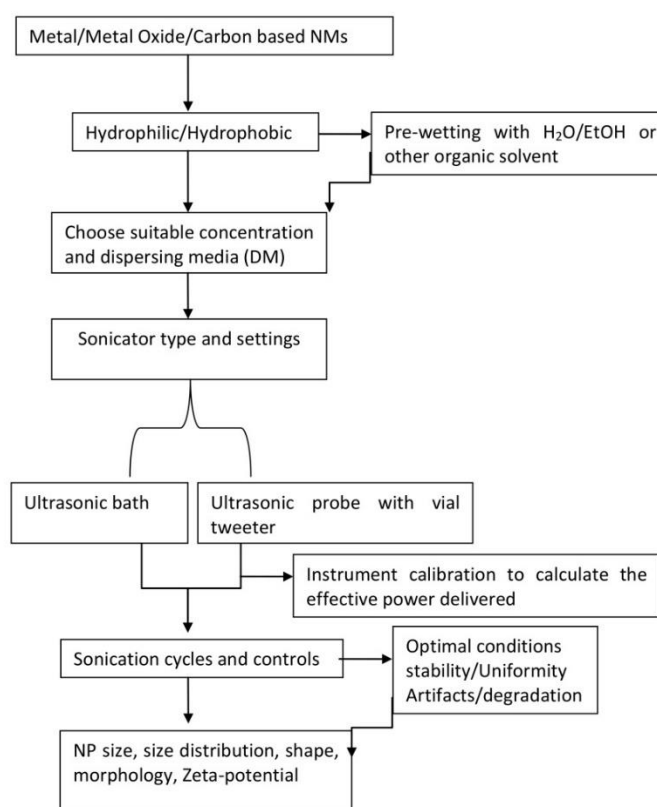


Figure 11. Logigramme décrivant le régime et la séquence par étapes du protocole de dispersion des nanomatériaux (d'après Kaur *et al.* 2017).

- **Choix des conditions expérimentales des essais toxicologiques**

Globalement, le choix des conditions expérimentales détermine la pertinence des résultats et le poids qu'il est possible de leur attribuer. Les trois paramètres majeurs sont : (i) les conditions de traitement (en termes de dose maximale étudiée et de gamme de doses, de durée, de fréquence, de mode d'exposition, etc.); (ii) le modèle mis en œuvre (type cellulaire ou espèce animale); et (iii) les interférences possibles avec le paramètre biologique mesuré.

- Les conditions de traitement

Pour un même nanomatériau, les caractéristiques des dispersions obtenues en termes d'agrégation/agglomération peuvent modifier le niveau d'exposition des modèles cellulaires, qu'ils soient en suspension ou adhérents, en jouant sur les vitesses de sédimentation des différentes tailles d'agrégats/d'agglomérats formés. En conséquence, la concentration intracellulaire, et donc possiblement le résultat des essais, peuvent être influencés. Il en est de même pour les conditions de traitement (nombre de cellules/ml ou cm², volume de traitement, surface des puits, etc.). C'est pourquoi il est important, lors de l'évaluation du danger associé aux nanomatériaux manufacturés, d'établir des procédures d'essai standardisées également sur ces points.

A ce jour, la question de la métrique la plus pertinente reste débattue. Dans les essais *in vitro*, la masse et la surface du nanomatériau par unité de surface du support de culture sont très généralement utilisées (si elle peut paraître optimale, l'expression de la concentration surfacique, *i.e.* surface des particules/unité de surface du support de culture, est rarement employée). La concentration en nombre de particules est plus délicate à utiliser car les techniques analytiques mises en œuvre pour contrôler la dosimétrie donnent des résultats très variables (Peterson *et al.* 2019). Dans les essais *in vivo*, du fait de la nécessité d'utiliser un référentiel masse, la dose est toujours exprimée en unité de masse du nanomatériau (*e.g.*, mg) par kg de poids corporel de l'espèce étudiée.

Les préparations des dispersions et la dosimétrie de l'exposition peuvent s'appuyer sur les recommandations de la publication de DeLoid *et al.* (2017).

- Pertinence des niveaux de doses

L'objectif de caractérisation des dangers implique généralement l'utilisation de doses élevées ce qui peut rendre difficile la comparaison des réponses obtenues dans des expérimentations *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, pour certains nanomatériaux, les doses utilisées dans des expérimentations *in vitro* peuvent se révéler suffisantes pour induire des effets de type pro-inflammatoires, toxiques et/ou génotoxiques sur des modèles cellulaires, alors que le même niveau de dose *in vivo* peut uniquement mobiliser des défenses anti-oxydantes sans effet délétère subséquent.

Globalement, des difficultés d'extrapolation entre les essais *in vitro* et *in vivo* se posent puisque les études *in vitro* sont souvent réalisées sur des expositions utilisant un temps de traitement inférieur ou égale à 24h avec des concentrations relativement élevées alors que les éventuels effets *in vivo* sont attendus sur du moyen/long terme en raison du délai nécessaire d'absorption et/ou d'accumulation potentielle des nanomatériaux dans certains organes. Ainsi, pour un même paramètre biologique étudié, les effets observés au cours des essais *in vitro* et *in vivo* peuvent se révéler différents voire contradictoires ce qui pose la question du niveau de prédictivité des expérimentations *in vitro*. Cette notion est d'autant plus importante du fait que l'on se tourne de plus en plus vers des méthodes de substitution à l'expérimentation animale, en particulier vers des modèles utilisant des cultures de cellules qui se doivent d'être le plus prédictifs possible. Il convient alors de travailler sur le design expérimental de l'expérience *in vitro*, en veillant à mettre en œuvre des expositions chroniques/répétées, à plus faibles concentrations, avec des nanomatériaux préparés dans un dispersant représentatif de celui

rencontré dans les conditions *in vivo*. Par exemple, afin d'améliorer le pouvoir prédictif des tests *in vitro* vis-à-vis de la toxicité intestinale de nanomatériaux, Marucco *et al.* (2020) soulignent l'importance de l'utilisation d'un simulant du système digestif humain comme milieu de dispersion.

Si les résultats *in vitro* doivent être utilisés pour prédire les effets *in vivo* des nanomatériaux, leur pertinence sera d'autant plus assurée que la dose *in vitro* sera extrapolée à partir d'une concentration *in vivo* pertinente (disponibilités de données toxicocinétiques). Une dose « point de départ » pour les études *in vitro* peut être fixée en pratiquant une extrapolation des données sur la charge organique *in vivo* pour la fixation de la dose à utiliser *in vitro* (Lan Ma-Hock *et al.* 2021). Cette démarche permet ainsi de réduire les difficultés à fixer des doses d'exposition pour les modèles *in vitro*.

In vivo chez l'animal, il faut également éviter l'utilisation de doses excessives, en fonction du type d'administration, et qui pourraient conduire à des résultats non pertinents. Tout d'abord, le choix de la dose maximale testée doit être dicté par la qualité (homogénéité et stabilité) de la dispersion. En effet, au-delà d'une certaine concentration initiale, la dispersion nanoparticulaire peut être hétérogène et ce niveau de saturation ne devrait pas être dépassé au risque d'entraîner des effets non intrinsèques et donc non pertinents sur un plan biologique. Dans tous les cas, une gamme de concentrations doit être utilisée afin d'évaluer le niveau de concentrations permettant d'obtenir une dispersion homogène et stable.

Le choix de la concentration maximale évaluée peut aussi s'appuyer sur des résultats d'essai démontrant un niveau de saturation de la dose intracellulaire, seuil qui ne devrait pas être dépassé au risque de générer des résultats non spécifiques (Summers 2013, Lammel 2019).

Enfin, lorsqu'elles sont disponibles, des données d'études de toxicocinétique peuvent également être utilisées pour fixer des doses expérimentales, y compris *in vitro*, en prenant en compte la charge nanoparticulaire observée au niveau de certains organes et en appliquant un facteur multiplicatif.

Dans tous les cas, il est donc nécessaire de justifier les niveaux de doses utilisées dans les tests d'évaluation mis en œuvre.

Ainsi, l'harmonisation et la normalisation des méthodes de dispersion appliquées pour évaluer la toxicité des nanomatériaux sont nécessaires afin de garantir une qualité de données comparable et de réduire au minimum les artefacts produits par les modifications d'un nanomatériau au cours de la préparation de la dispersion. De telles harmonisations et normalisations permettront également d'améliorer la comparabilité entre les essais, les laboratoires et les études sur les différents types de nanomatériaux.

Il apparaît donc indispensable de justifier, dans tous les tests d'évaluation toxicologique :

- la méthode de préparation de la suspension nanoparticulaire ;
- la nature du dispersant utilisé ;
- l'ajout de co-formulants (sérum, mucus...) le cas échéant ;
- la méthodologie suivie pour disperser les nanoparticules ;
- la métrologie mise en œuvre pour contrôler la dispersion.

- **Le choix du système d'essai**

- Le modèle cellulaire

Le choix du modèle cellulaire est également un paramètre très important. En effet, en fonction de la lignée cellulaire utilisée (humaine, animale, etc.) et du tissu d'origine, les cellules vont être plus ou moins sensibles à une exposition à des nanomatériaux manufacturés. De par leur origine, elles peuvent utiliser des voies métaboliques différentes, n'ont pas forcément les mêmes récepteurs à leur surface membranaire, les mêmes capacités de réparation de l'ADN et peuvent avoir des statuts antioxydants différents.

Par exemple, la génotoxicité des nanomatériaux dépendant majoritairement de mécanismes oxydants, si des cellules pauvres ou démunies en systèmes antioxydants sont utilisées, les effets peuvent être exacerbés.

Il faut donc choisir un modèle cellulaire :

- préférentiellement d'origine humaine et, dans la mesure où l'information est disponible (données d'études de toxicocinétique), représentatif d'un organe possiblement exposé ;
- dont la représentativité biologique et les performances ont été caractérisées (origine, capacités de détoxification, systèmes antioxydants, endo et exocytose, etc.).

Enfin, concernant la méthode de culture et le mode de traitement, plusieurs choix sont possibles:

- de façon classique, en 2D, en monocouches ;
- en co-culture ;
- sur des inserts pour faire croître les cellules en trois dimensions, pour travailler sur plusieurs compartiments.

Le design concernant la méthode de culture et le mode de traitement mis en place doivent être argumentés.

- Le choix du modèle animal

De façon générale, comparativement aux modèles cellulaires, il existe moins de restriction pour le choix du modèle animal et les espèces recommandées dans les lignes directrices peuvent être utilisées.

Pour les études toxicocinétiques, l'espèce animale choisie doit être prédictive pour l'Homme, ce qui peut être complexe en raison des phénomènes d'opsonisation²⁹, qui varient d'une espèce à l'autre.

Ainsi, en cas de réalisation d'essais *in vivo*, le choix du modèle animal doit également être argumenté même si pour des expositions par voie orale, les recommandations des lignes directrices peuvent être appliquées.

- **Interférences avec les paramètres mesurés**

Les nanomatériaux peuvent interférer avec les constituants des milieux utilisés dans les tests d'évaluation de (cyto)toxicité, en particulier avec les réactifs utilisés (colorants, agents fluorescents, etc.) ce qui peut entraîner un biais dans la réponse.

Des incompatibilités avec certaines conditions expérimentales peuvent également être observées, en particulier pour les deux tests de génotoxicité couramment utilisés : le test des comètes (test de fragmentation de l'ADN), et le test du micronoyau (test d'aberrations chromosomiques)³⁰.

En effet, pour le test du micronoyau *in vitro*, la cytochalasine B est souvent utilisée dans le protocole standard pour bloquer les cellules à une certaine phase de la mitose³¹. Cependant, cette substance inhibe l'endocytose des nanomatériaux ce qui entraîne un risque d'obtenir un résultat négatif qui n'est pas pertinent. Si l'utilisation de cytochalasine B est requise, elle doit donc être ajoutée après quelques heures ou en fin de traitement. Par ailleurs, en fonction de la nature du nanomatériau, l'accumulation dans le cytoplasme peut générer des interférences sur la lecture du test avec le risque que des micronoyaux puissent être occultés par les nanomatériaux (Charles *et al.* 2018; Jalili *et al.* 2018). Cependant, dans ces 2 cas, des adaptations du test sont possibles.

Pour le test des comètes, la présence de nanomatériaux résiduels postérieure au traitement peut entraîner des interactions avec l'ADN lors de la phase d'électrophorèse, ce qui risque de générer un résultat positif ou négatif non pertinent.

Il apparaît donc nécessaire d'apporter des modifications et des adaptations pour améliorer la sensibilité et la spécificité des tests, en particulier *in vitro*, ce qui permet d'éviter la réalisation de tests *in vivo* qui sont généralement mis en œuvre en cas de réponse significative dans les tests *in vitro*.

Il est important de noter que des interférences sont également susceptibles de se produire entre certains nanomatériaux et certains tests de cytotoxicité *in vitro* (Guadagnini *et al.* 2015). Il est donc recommandé pour établir sans ambiguïté la cytotoxicité de nanomatériaux :

- de tester les interférences possibles avec les réactifs et les conditions du test en commençant par des contrôles acellulaires pour vérifier que les nanoparticules

²⁹ Opsonisation : processus biochimique par lequel une molécule recouvre la membrane d'une cellule cible pour favoriser sa phagocytose.

³⁰ Aberration chromosomique : altération au niveau des chromosomes (anomalie qui peut être de structure ou de nombre).

³¹ Mitose : les événements chromosomiques de la division cellulaire.

n'interfèrent pas avec les réactifs et avec le type de mesure mise en œuvre lors du test ;

- d'utiliser en parallèle au moins deux types de tests, basés sur des principes différents.

Il est également important de tester les artéfacts dus aux conditions de culture (utilisation d'un simulatant de fluide biologique, contenu protéique du milieu, utilisation de sérum bovin versus sérum humain (Pisani *et al.* 2017) et des interactions possibles avec les nanomatériaux.

Dans les modèles de co-cultures *in vitro* l'utilisation d'inserts (type Transwell) peut entraver la translocation par l'adsorption des nanomatériaux sur ou au sein du filtre. Il convient donc d'effectuer les contrôles adéquats d'une éventuelle rétention des nanomatériaux au niveau du filtre de l'insert en condition acellulaire.

3.2.5.3. Données toxicologiques requises

Comme mentionné en préambule et décrit en Figure 9, la méthodologie relative à l'identification et la caractérisation du danger de la fraction nanométrique des nanomatériaux repose sur une approche séquentielle. En première intention, le GT a établi la liste des données toxicologiques requises. Les résultats issus de ces études vont conditionner la mise en place d'études toxicologiques complémentaires. Les interactions entre ces différentes études sont schématisées en Figure 12 et explicitées ci-dessous.

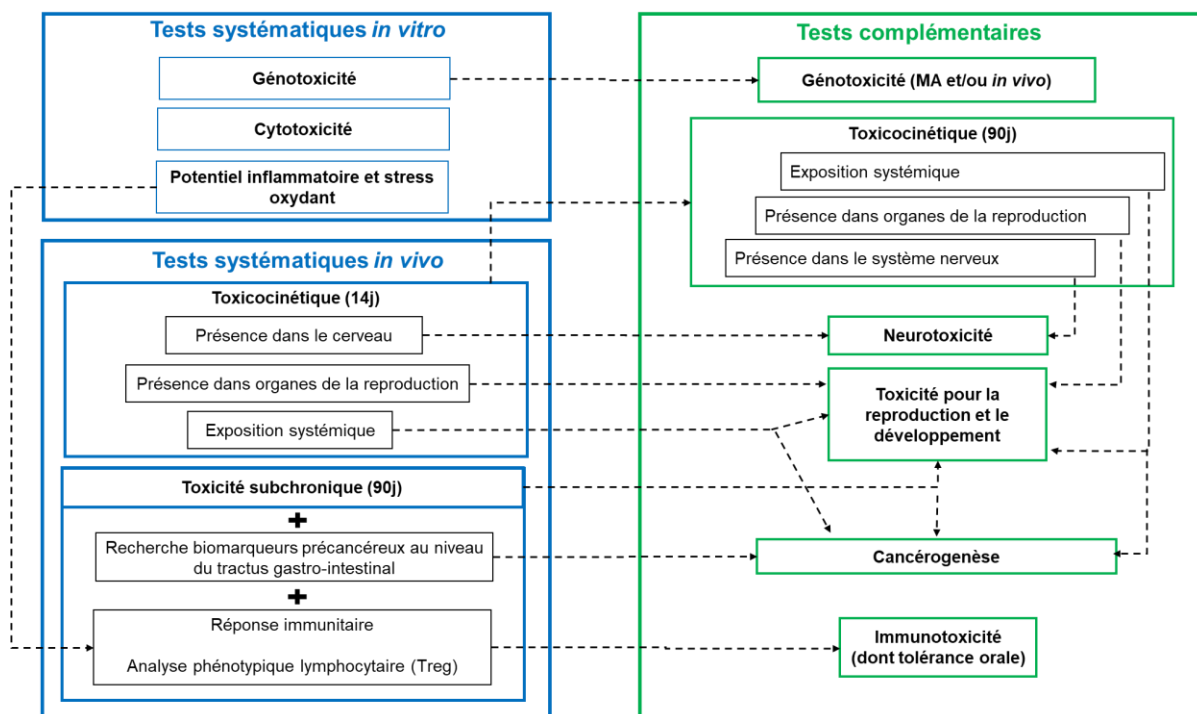


Figure 12. Liste des données toxicologiques systématiques requises (en bleu) et des études toxicologiques complémentaires (en vert).

3.2.5.3.1. Cytotoxicité, potentiel inflammatoire et stress oxydant (*in vitro*)

Les résultats des tests *in vitro* relatifs à la cytotoxicité, au potentiel inflammatoire et au stress oxydant ne peuvent être utilisés en tant que tel pour une ERS nanospécifique. Néanmoins, l'exploitation de ces résultats va permettre d'orienter et d'élaborer les tests *in vivo*.

Lors de l'ingestion, les nanomatériaux issus de l'alimentation peuvent interagir avec les différents organes du tractus digestif, tels que la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin. Chacun de ces organes présente des conditions physiologiques et des types cellulaires distincts. L'impact potentiel (devenir et effet) des nanomatériaux peut donc s'exercer différemment sur chacun de ces organes. Dans l'idéal, l'évaluation toxicologique *in vitro* devrait être réalisée sur des modèles cellulaires représentatifs de chacun de ces organes.

- **Systèmes cellulaires**

Un large panel de systèmes cellulaires est disponible pour la réalisation d'études *in vitro*. Les cellules primaires, directement isolées d'organes, présentent plusieurs limites : elles sont souvent techniquement difficiles à cultiver/entretenir sur de longues périodes, et peuvent présenter des réponses variables d'un individu à l'autre.

Les lignées cellulaires établies par immortalisation ou bien d'origine cancéreuse sont plus aisées à utiliser mais ces cellules modifiées ne présentent pas tous les caractères géno/phénotypiques des cellules primaires. Les cellules peuvent être cultivées seules ou en co-culture. Les monocultures sont plus aisées à utiliser et plus faciles à normaliser pour effectuer les tests de cytotoxicité. Il faut néanmoins veiller à limiter le nombre de passages pour éviter les phénomènes de dérives, c'est-à-dire la perte de caractères géno/phénotypiques.

Les cellules du tractus digestif les plus utilisées sont celles de l'intestin, organe majeur de contact. Les plus étayées sont les monocultures de cellules épithéliales. De nombreux travaux ont été réalisés sur les cellules humaines Caco-2 car elles peuvent se différencier en cellules présentant de nombreuses caractéristiques des entérocytes et peuvent être conservées en culture différenciée pendant plusieurs jours. Elles permettent également, grâce à la formation d'un épithélium intestinal jointif, de réaliser des études de perméabilité (mesures d'intégrité et cinétique de transport à travers la barrière intestinale). Ces cellules peuvent être cultivées soit en plaques pour étudier l'accumulation, les effets toxiques, etc., soit sur des membranes semi perméables de type insert pour les études de transport.

Plus récemment, afin de mieux représenter l'épithélium intestinal, les modèles *in vitro* se sont complexifiés en systèmes de co-cultures. Généralement, ils associent aux cellules Caco-2 des cellules épithéliales sécrétant du mucus (HT29-MTX) et/ou des cellules immunitaires de type macrophages, comme la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP1 ou des cellules RajiB, favorisant la différenciation en cellules "M" typiques de l'épithélium bordant les plaques de Peyer. L'utilisation de ces co-cultures fournit ainsi des conditions plus proches de celles qui existent *in vivo*, en particulier un épithélium muco-sécrétant tel que celui qui borde l'iléon (Lehner *et al.* 2020) et la présence de cellules M souvent associées à l'internalisation des

nanomatériaux et leur passage depuis la lumière intestinale vers le follicule lymphoïde (des Rieux *et al.* 2005).

Dans les études de transport des nanoparticules, des protocoles *ex vivo* dans lesquels des explants d'intestin sont disposés dans des chambres de Ussing peuvent être utilisés. Ces explants sont viables pendant 2 à 4 h, et permettent donc d'analyser l'absorption des nanoparticules sur des temps courts (Brun *et al.* 2014).

Il existe également des modèles cellulaires de la cavité buccale (TR146, SVpgC2a) et de l'épithélium stomacal, même si les études de cytotoxicité restent encore peu nombreuses sur ces modèles.

Après le passage de la barrière intestinale, les nanomatériaux sont susceptibles d'entrer dans le système circulatoire et d'atteindre d'autres organes comme le foie, la rate, les reins, les poumons, voire le cerveau. Dans le cas où le passage de la barrière intestinale est suspecté, il est souhaitable de compléter les tests de cytotoxicité sur des modèles cellulaires représentatifs de ces organes systémiques telles que des cellules hépatocytaires. De même, le système immunitaire est une cible potentielle des nanomatériaux. Des modèles de cellules immunitaires peuvent être utilisées, par exemple des macrophages, qui sont en première ligne lors d'une exposition à des nanomatériaux et qui orchestrent la réponse inflammatoire locale au niveau de l'intestin et au sein de l'organisme.

Dans tous les cas, les lignées doivent être caractérisées en précisant l'origine des cellules, les milieux de culture, le nombre de passages, le temps de division cellulaire, leur morphologie et leur état de différenciation avant et pendant l'exécution du test³².

- **Dosimétrie**

L'évaluation de la dose délivrée aux cellules et de la dose internalisée est importante pour valider et interpréter correctement les données de cytotoxicité *in vitro*. Outre les informations sur la masse de particules par volume d'incubation ou la masse de particules par surface de culture cellulaire, il convient également de fournir des données sur le volume d'incubation, la surface des puits, le nombre de cellulesensemencées, la surface spécifique des nano-objets, la vitesse de sédimentation, etc. L'internalisation des nanomatériaux peut être vérifiée par des observations en microscopie électronique-EDX de cellules exposées. Les techniques d'ICP permettent, elles, de quantifier cette internalisation. Des approches basées sur la modélisation de la sédimentation des nanoparticules ont été développées et permettent de calculer la dose effective, comme par exemple les modèles ISDD et ISD3 (Thomas *et al.* 2018).

- **Les tests de toxicité in vitro à mettre en place**

Les effets des nanomatériaux peuvent être étudiés au travers de tests de viabilité/toxicité cellulaire, mais également au travers de la réponse cellulaire au stress oxydant ou de réponses pro-inflammatoires par libération de cytokines.

³² OCDE : Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP)

Le schéma expérimental incluant les conditions de traitement (durées d'exposition, concentration de sérum, changements de milieu réalisés, etc.) et les conditions de mesure doivent être bien définies et justifiées par rapport aux différents paramètres testés. Les conditions d'exposition ne doivent pas provoquer d'effets indirects (hypoxie, changement de pH, etc.) interférant sur les réponses cellulaires. Pour les systèmes de cultures sur inserts, l'intégrité de la barrière cellulaire peut être vérifiée par mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) ou par le passage d'un marqueur (ex : Jaune Lucifer, Dextran marqué).

La majorité des tests peut être réalisée par une grande diversité de méthodes colorimétriques ou fluorimétriques,

- Tests de viabilité/mort cellulaire et de mesure du métabolisme cellulaire

Il existe une batterie de tests permettant d'estimer la viabilité/ cellulaire en étudiant :

- la rupture de la membrane par le test de fuite de la lactate déshydrogénase (LDH) ou par l'exclusion d'un colorant vital (ex : bleu Trypan) ;
- l'altération de l'activité lysosomale (ex : rouge neutre) ;
- l'altération de l'activité mitochondriale (ex : MTT, MTS, WST-1, WST-8, tests basés sur la résazurine) ;
- l'énergie intracellulaire par la mesure de l'ATP ;
- l'apoptose (ex :caspases, annexine V).

- Stress oxydant

Il existe de nombreux tests de mesure du stress oxydant basés sur la caractérisation de l'accumulation cellulaire d'espèces oxydantes ainsi que sur l'altération des systèmes antioxydants cellulaires.

Des tests acellulaires peuvent être réalisés afin d'évaluer le potentiel oxydant intrinsèque du nanomatériau testé. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que les produits non radicalaires (peroxyde d'hydrogène) et radicalaires (anion superoxyde, radical hydroxyle, etc.) peuvent induire des modifications des macromolécules cellulaires (oxydation de l'ADN, des acides aminés, des protéines et des acides gras polyinsaturés). La détection des ERO et des modifications engendrées peuvent constituer des paramètres de suivi. De plus, la mesure des capacités anti-oxydantes (quantité ou activité d'enzymes anti-oxydantes, ratio glutathion oxydé / réduit) peuvent également être utilisés comme marqueurs de stress oxydant.

- Tests d'immunotoxicité

L'évaluation des effets immunotoxiques peut être abordée *in vitro* en étudiant le potentiel inflammatoire sur des cellules épithéliales ou immunitaires (Aiba *et al.* 2017). Il s'agit d'évaluer la capacité des nanomatériaux à provoquer une réponse inflammatoire en mesurant les

médiateurs de l'inflammation, classiquement les cytokines pro-inflammatoires (ex : TNF alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, MIF) et anti-inflammatoires (ex : TGF beta, IL-10) constitutives de l'immunité innée (défenses rapides et non spécifiques). Certaines méthodes permettent la détection simultanée de plusieurs médiateurs pro- et anti-inflammatoires (analyse multiplexée basée sur le profilage des cytokines (Bhattacharya *et al.* 2017). L'activation du facteur de transcription NF-kappaB (un facteur cytoplasmique qui active la transcription de nombreux gènes de la réponse inflammatoire) peut également être envisagée comme marqueur de l'activité inflammatoire.

Par ailleurs, des observations en conditions stimulées de ces mêmes types cellulaires (immunitaire et épithéliale), par exemple par des endotoxines (e.g., lipopolysaccharide ou LPS) naturellement pro-inflammatoires permettront d'apprécier le potentiel d'effets adjuvant ou répresseur des nanomatériaux sur les réponses préalablement induites par les toxines.

Quelle que soit la nature des résultats obtenus *in vitro*, ils seront à confirmer dans une étude de toxicité orale subchronique de 90 jours. Par ailleurs, ces études *in vivo* permettent d'apprécier l'effet sur l'immunité adaptative (e.g., tolérance orale aux antigènes alimentaires) à médiation cellulaire et humorale et reliant différents compartiments du système immunitaire.

- **Perspectives : stratégies de test intégrées**

Afin d'affiner, de réduire et/ou de remplacer l'utilisation de l'animal dans les approches toxicologiques traditionnelles, la promotion de méthodes alternatives à l'expérimentation animale est vivement encouragée par de nombreuses instances internationales (OCDE, EFSA, Commission Européenne, NIH...).

Dans cette optique, des stratégies de tests intégrées (STI) sont développées. En combinant des tests *in vitro*, des méthodes de modélisation (*in silico*), des méthodes « omiques » (génomique, protéomique, métabolomique), l'exploitation des données existantes, l'utilisation de seuils de préoccupation toxicologique ainsi que des approches par lecture croisée (read across), les propriétés toxicologiques peuvent être renseignées afin d'identifier les dangers.

Actuellement, de nombreux travaux sont entrepris pour aller vers une modification du système standard d'évaluation des risques pour la santé humaine, en particulier en proposant des tests centrés sur le mode d'action qui permettent de prédire des effets toxiques. En outre, ces études mécanistiques peuvent être utilisées pour analyser la pertinence d'essais *in vivo* ultérieurs plus ciblés. Dans ce contexte, la possibilité de s'appuyer sur les voies d'effets indésirables (Adverse Outcome Pathways ou AOP) comme cadre mécanistique pour évaluer les effets néfastes spécifiques des nanomatériaux a été examinée (Gerloff *et al.* 2017 ; Halappanavar *et al.* 2019 ; OCDE). Ce processus permettant l'identification d'éléments clés (Key Events, KE) associés à l'exposition *in vitro* ou *in vivo* à des nanomatériaux est prometteur et devrait être exploré davantage à court, moyen et long terme avant son application.

Enfin, concernant les choix de systèmes cellulaires à considérer pour les tests *in vitro*, un niveau de complexité supérieur est obtenu par l'utilisation soit d'épithéliums intestinaux reconstitués soit d'organoïdes intestinaux en 3 dimensions. Ainsi, les miniguts, différenciés à partir de cryptes intestinales, ont été initialement développés sous forme d'unités auto-organisées qui contiennent l'ensemble des types cellulaires que l'on trouve dans l'épithélium

intestinal (Sato *et al.* 2009). Très récemment, ces organoïdes ont été développés sur des supports alimentés par un système microfluidique permettant d'obtenir une organisation étalée reproduisant la morphologie de l'épithélium intestinal (Nikolaev *et al.* 2020).

3.2.5.3.2. Génotoxicité *in vitro*

Les nanomatériaux peuvent potentiellement induire des effets génotoxiques primaires directs, indirects ainsi que des effets génotoxiques secondaires comme cela est schématisé dans les Figures ci-dessous.

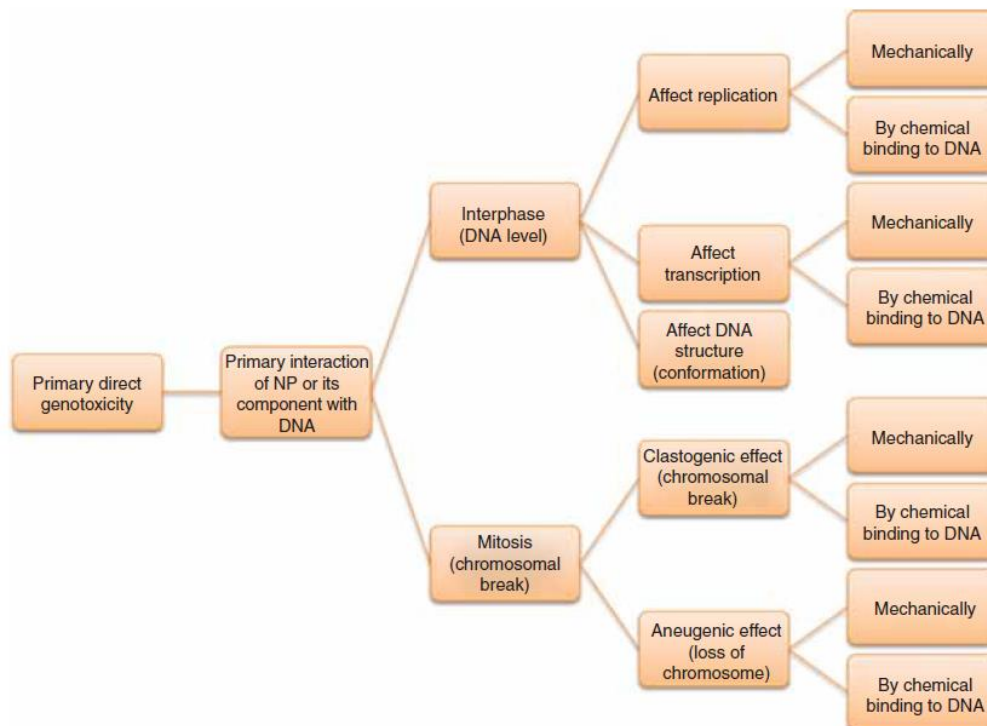


Figure 13. Schéma d'induction potentielle de génotoxicité primaire directe par des nanomatériaux (d'après Magdolenova *et al.* 2014).

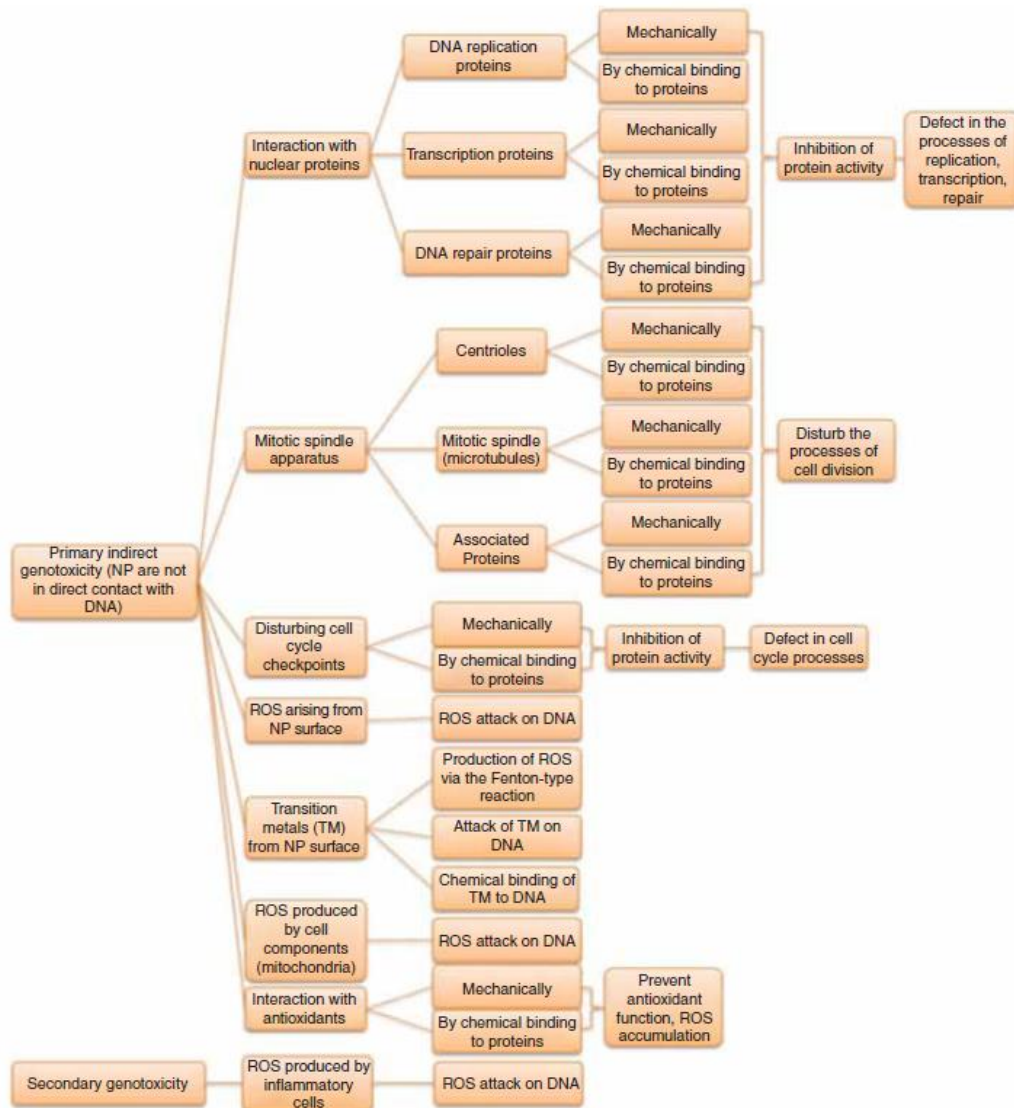


Figure 14. Schéma d'induction potentielle de géotoxicité primaire indirecte et secondaire par des nanomatériaux (d'après Magdolenova et al. 2014).

Les propriétés géotoxiques et mutagènes des nanomatériaux sont souvent étroitement liées à la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN). Le « stress oxydant » peut être défini comme étant un déséquilibre entre la production d'espèces réactives à l'oxygène et les capacités antioxydantes de l'organisme. Ce mécanisme est sans doute le plus largement accepté pour son implication dans l'activité géotoxique potentielle des nanomatériaux même s'il peut ne pas être exclusif. Les différentes voies de génération de phénomènes oxydants médiés par des (nano)matériaux et leur implication dans les processus de géotoxicité primaire et secondaire sont connues depuis plusieurs années et ont été décrites par Schins et Knaapen (2007).

Afin de couvrir les différents événements génétiques menant possiblement à la génotoxicité, il est nécessaire de recourir à une batterie minimale de tests. Ainsi, l'EFSA (2011) a recommandé la combinaison de 2 tests *in vitro*, l'essai de mutation sur bactéries (test d'Ames, OCDE TG 471) et le test du micronoyau *in vitro* (OCDE TG 487).

Cependant, le test d'Ames réalisé sur bactéries est considéré comme non pertinent pour évaluer la mutagénicité des nanomatériaux en raison d'un risque élevé de résultats faussement négatifs (car il est probable que certains nanomatériaux ne soient pas capables de traverser la paroi bactérienne). Doak *et al.* (2012) ont d'ailleurs conclu que "bien que le test d'Ames soit un test de mutagenèse fiable pour l'évaluation des substances chimiques, il ne semble pas être approprié pour l'évaluation des nanomatériaux". Afin d'évaluer le paramètre d'induction de mutation génique, un test sur cellules de mammifères doit être effectué (OCDE TG 476 ou 490).

De plus, du fait que certains nanomatériaux sont en mesure d'induire des aberrations chromosomiques de type structurel (clastogénèse) et/ou numérique (aneuploïdie), le test *in vitro* du micronoyau (OCDE 487) apparaît comme étant bien adapté car il est capable de mettre en évidence ces deux types d'effets (Pfuhrer *et al.* 2013) et peut être réalisé sur d'éventuelles cellules cibles, à condition de démontrer l'internalisation des nanomatériaux par la lignée cellulaire utilisée. Cette méthode a été considérée comme la plus prédictive lors du projet Nanogenotox³³. Enfin, l'incompatibilité avec certaines conditions expérimentales doit être vérifiée, par exemple la co-exposition simultanée de nanomatériaux et de cytochalasine B qui inhibe l'endocytose (Doak *et al.* 2009).

- **Tests *in vitro* standardisés**

Une évaluation critique des connaissances sur la mutagenèse et la génotoxicité des nanomatériaux a révélé que certains modèles standards ne sont pas bien adaptés, voire ne sont pas applicables à l'étude de ces derniers. Par exemple, la paroi cellulaire bactérienne pouvant constituer une barrière pour de nombreux nanomatériaux, les systèmes d'essai bactériens sont probablement insuffisants pour garantir une exposition de l'ADN et ne peuvent donc pas être considérés comme suffisamment robustes. Si le test d'Ames qui est réalisé sur un système d'essai bactérien est un test fiable pour l'évaluation de substances chimiques, il ne semble pas être adapté à l'évaluation de la mutagenèse des nanomatériaux en raison du risque élevé de résultats faussement négatifs (Balasubramanyam *et al.* 2010) et son utilisation n'est donc pas recommandée (Doak *et al.* 2012 et OCDE 2014).

Comme alternative au test de mutation génique sur bactéries, les tests de mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifères (OCDE TG 476, 490)³⁴, pour lesquels aucune publication n'a encore identifié de limites spécifiques pour l'évaluation des nanomatériaux, sont recommandés. Cependant, même si les tests utilisant les systèmes TK (Thymidine Kinase) ou HPRT (Hypoxanthine Phospho Ribosyl Transférase) ont été adaptés sur des cellules

³³ Nanogenotox European Project (March, 2010 – February, 2013). <http://www.nanogenotox.eu/>

³⁴ OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes, 29 July 2016. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene, 29 July 2016.

lymphoblastoïdes humaines de type TK6 ou WIL2-NS (Canova *et al.* 2005 ; Wang *et al.* 2007 ; Kim *et al.* 2017), il faut rappeler que de façon standard, ces tests utilisent principalement des cellules de rongeurs (L5178Y, CHO, V79) présentant des déficiences (faible quantité d'enzymes de détoxification, déficience en expression de p53, instabilité caryotypique, etc.), qui peuvent entraîner une surestimation des effets observés et conduire à une évaluation incorrecte. En outre, leur origine non humaine pourrait également limiter leur pertinence car les lignées de cellules de rongeurs sont considérées comme plus susceptibles de donner des résultats faussement positifs qui ne seraient pas observés avec un système d'essai plus pertinent (Fowler *et al.* 2012).

De manière complémentaire et afin de rechercher l'éventuelle induction d'aberrations chromosomiques (structurelles et numériques) par les nanomatériaux, le test du micronoyau, pour lequel une ligne directrice de l'OCDE existe (OCDE TG 487), devrait être utilisé. Il est à noter qu'une adaptation du protocole est nécessaire, puisque dans sa version la plus classiquement utilisée, ce test comprend une étape de blocage de la cytokinèse par l'emploi de cytochalasine B, qui pourrait entraver l'internalisation cellulaire des nanomatériaux. Ainsi, il convient d'exposer les cellules aux nanomatériaux dans un premier temps, puis de les exposer à la cytochalasine B *a posteriori*, comme décrit par Gonzalez *et al.* (2011). De plus, comme mentionné précédemment, la possible accumulation de nanomatériaux dans le cytoplasme pourrait générer des interférences lors de l'analyse des lames au microscope avec le risque que des micronoyaux puissent être occultés par les particules. L'utilisation de la cytométrie en flux pourrait permettre de contrecarrer cette limite.

L'exploitation des résultats relatifs aux tests *in vitro* de génotoxicité systématiquement requis sera explicitée dans la partie 3.2.5.4.1 concernant les études de génotoxicité complémentaires.

3.2.5.3.3. Toxicocinétique

Les études de toxicocinétique ont pour objectif d'évaluer le comportement d'un composé après son entrée dans un organisme. Elles renseignent sur les phénomènes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (ADME). En identifiant les organes dans lesquels le composé (ou ses métabolites) sont retrouvés, elles permettent d'orienter les études de toxicité pour se focaliser sur des organes qui peuvent constituer des cibles potentielles. En ce qui concerne les nanomatériaux, les études de toxicocinétique vont principalement s'attacher aux phénomènes d'absorption et de distribution en évaluant la capacité des nanomatériaux à traverser certaines barrières biologiques (intestinale, pulmonaire, hémato-encéphalique par exemple) et à se distribuer dans les différents organes. Des informations relatives à l'excrétion des nanomatériaux *via* leur quantification dans les fèces, l'urine et la bile peuvent également être collectées. Les études pour la toxicocinétique doivent prendre en compte les principes de la ligne directrice OCDE n°417. Cependant, cette ligne directrice n'étant pas adaptée aux nanomatériaux, les aspects spécifiques listés ci-dessous doivent être considérés.

Concernant la voie d'administration, il est généralement admis que le gavage permet de s'assurer de la dose exacte administrée. Cependant, dans ce cas, l'administration est réalisée en intragastrique, et les premiers organes du tractus (bouche et œsophage) ne sont donc pas

directement exposés. Pour tenir compte de ces premières zones de contact, il est possible de réaliser des administrations soit dans l'eau de boisson soit dans l'aliment. Dans ce cas, il est plus difficile d'estimer la dose ingérée par chaque animal. De plus, dans ces cas, il est nécessaire de vérifier la stabilité des nanomatériaux dans l'eau ou l'aliment.

Dans les études réalisées par voie orale, les nanomatériaux sont généralement faiblement absorbés à travers la barrière intestinale (seulement quelques % de la dose administrée en masse) (Shi *et al.* 2013; Jones *et al.* 2015; Geraets *et al.* 2014) cependant l'accumulation dans certains organes systémiques en particulier le foie, la rate et les reins est souvent rapportée (Loeschner *et al.* 2011; Kermanizadeh *et al.* 2015; Brand *et al.* 2020; Krause *et al.* 2020; Heringa *et al.* 2018).

Ainsi, il apparaît nécessaire d'évaluer la distribution après des administrations répétées et sur un temps suffisamment long (14 jours). Cette durée d'exposition devrait permettre de prendre en compte la faible absorption intestinale et les problèmes de limite de détection des méthodes analytiques utilisées. De même, les doses testées devront être estimées en prenant en compte ces limitations sans pour autant engendrer de toxicité qui pourrait affecter la cinétique.

Considérant que certaines publications rapportent un effet du sexe sur la distribution, l'accumulation ou la toxicité des nanomatériaux (Han *et al.* 2020 ; Tassinari *et al.* 2020 ; Mohammadpour *et al.* 2019 ; Chen *et al.* 2013 ; Kim *et al.* 2011 ; Kim *et al.* 2007), les études de toxicocinétique doivent être réalisées chez les 2 sexes. Il est cependant important de noter qu'une plus grande variabilité des données de quantification peut être attendue pour les femelles puisque la période du cycle peut influencer sur la perméabilité intestinale (Braniste *et al.* 2009). Afin de diminuer cette variabilité, il peut s'avérer nécessaire de synchroniser au préalable les cycles des femelles.

Pour la distribution des nanomatériaux, une attention toute particulière doit être portée sur le tractus gastro-intestinal, le cerveau, les organes de la reproduction (car ces informations seront essentielles pour le déclenchement de tests de toxicité complémentaires) ainsi que sur les organes pour lesquels l'accumulation de nanomatériaux comme la rate, le foie et les reins a déjà été régulièrement observée. Concernant le tractus gastro-intestinal, outre des prélèvements du petit et du gros intestin, il est important de disposer d'échantillons avec des tissus lymphoïdes (plaques de Peyer et ganglions lymphatiques mésentériques), potentielles zones de passage des nanomatériaux (Bouwmeester *et al.* 2017 ; Janer *et al.* 2014 ; Geraets *et al.* 2014). Des contrôles négatifs recevant uniquement le véhicule sont obligatoirement inclus dans les études. Il est également important de vérifier que les doses utilisées n'ont pas altéré de manière trop marquée l'épithélium intestinal ce qui pourrait remettre en cause les résultats obtenus pour la distribution systémique. Ainsi, il est recommandé de disposer de données histologiques sur le tractus gastro-intestinal. Des données complémentaires sur la perméabilité intestinale à l'aide de marqueurs (créatinine, différentes tailles de Dextran, ⁵¹Cr-EDTA) peuvent également être générées.

Si les résultats obtenus dans l'étude cinétique de 14 jours ne montrent pas de distribution des nanomatériaux (tractus gastro-intestinal, cerveau, organes sexuels, foie, rate et reins), il faudra procéder à une analyse à plus long terme lors de l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours pour évaluer la distribution et la quantification éventuelle dans les organes listés précédemment en priorité. Dans le cas où des résultats de distribution ont été obtenus lors de

l'étude de toxicocinétique sur 14 jours, une comparaison des résultats de distribution lors de l'étude sur 90 jours pourrait mettre en évidence si un effet de redistribution dans certains organes peut avoir lieu au cours du temps.

Les paramètres analytiques (rendement d'extraction, LOD et LOQ) des méthodes employées pour les dosages devront être indiqués pour chacun des organes étudiés. Dans certains cas, des contaminations externes (via l'alimentation par exemple) peuvent générer des niveaux de base élevés dans les contrôles négatifs, empêchant la détection d'une augmentation dans les organes systémiques des animaux traités (en considérant un faible passage de la barrière intestinale). Même si cela est souvent difficilement réalisable, certaines solutions peuvent être proposées pour baisser au maximum ce niveau de base : par exemple, la silice étant un élément retrouvé dans l'alimentation des rongeurs mais aussi dans le matériel scientifique en verre, des conditions expérimentales particulières ainsi qu'une nourriture appropriée avec une faible teneur en silice sont nécessaires (Aureli *et al.* 2020).

Les méthodes de quantification classiques se limitent majoritairement aux analyses par plasma à couplage inductif (ICP) couplé à différents systèmes de détection (spectrométrie de masse (ICP-MS), spectrométrie d'émission optique (ICP-OES)). Cependant, en dehors de la technologie single particule (sp-ICP-MS), ces méthodes ne permettent pas de distinguer les formes particulaires des formes ioniques. Aussi, afin de distinguer les formes particulaires constitutives des nanomatériaux, des méthodes d'analyse complémentaires sont nécessaires (par exemple, microscopie électronique, SAXS³⁵, Tof-SIMS³⁶) mais ces dernières ne permettent d'analyser qu'un nombre limité d'échantillons. Pour certains nanomatériaux qui ne sont pas analysables par ICP et/ou dans l'optique de faciliter leur détection, des nanomatériaux marqués par des techniques de fluorescence, de radioactivité ou constitués de cœurs métalliques peuvent être utilisés. Dans ce cas, il est important de vérifier au préalable que 1) le marquage n'impacte pas les propriétés physico-chimiques des nanomatériaux (ce qui pourrait modifier leur comportement) et 2) le marquage est stable et n'est pas perdu au cours de l'étude ce qui amènerait à de fausses conclusions.

Des études complémentaires pour évaluer la persistance et l'excrétion des nanomatériaux peuvent être réalisées en adaptant le design expérimental avec des périodes de récupération après un traitement répété.

- **Perspectives**

Compte tenu du concept des 3R (réduire, remplacer, raffiner) et des actions engagées pour limiter l'expérimentation animale, les perspectives d'un point de vue cinétique s'organisent autour d'approches *in vitro* et *in silico*.

Pour les approches *in vitro*, les données de cinétique concernant l'absorption par voie orale peuvent s'appuyer sur des études de passage utilisant des modèles de barrière intestinale humaine. Pour cela, des cultures de cellules épithéliales intestinales plus ou moins complexes (possibilité de co-cultures avec des cellules à mucus ou avec de l'induction de cellules M) sont réalisées sur des membranes poreuses (inserts). Si ces études sur cellules intestinales

³⁵ Diffusion des rayons X aux petits angle

³⁶ Spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol

disposent d'un document guide produit par l'ECVAM³⁷, d'autres modèles *in vitro* de barrière sont également disponibles (exemples : placentaire, hémato-encéphalique, testiculaire). Cependant leur utilisation pour les nanomatériaux reste controversée compte tenu des limites rencontrées (barrière physique de l'insert, faible passage et limite de détection des méthodes). Pour certaines barrières (intestin, placenta), des systèmes *ex-vivo* peuvent être utilisés, cependant ces systèmes sont plus difficiles à manipuler, présentent une variabilité de réponse en fonction du donneur et ne permettent d'étudier qu'un nombre très limité de nanomatériaux à la fois.

Pour les approches *in silico*, deux approches complémentaires sont à préconiser.

L'extrapolation *in vitro/in vivo* (IVIVE) permet de relier le comportement des nanomatériaux *in vivo* chez l'animal à des données obtenues *in vitro* pour simuler ce qui se passe chez l'Homme. Les données de cinétique *in vivo* sont alors couplées à des données de cinétique *in vitro* collectées sur des modèles cellulaires humains (par exemple passage de la barrière intestinale, clairance hépatique et rénale).

Par ailleurs, des modèles mathématiques basés sur la physiologie (PBTK physiologically-based toxicokinetics) peuvent être générés en associant des données issues d'études de toxicocinétique, des données physiologiques de l'organisme considéré (telles que les volumes tissulaires, le flux sanguin) et des paramètres physico-chimiques et biochimiques des nanomatériaux (Utembe *et al.* 2020). Ces modèles ont pour objectif de prédire le comportement de nanomatériaux chez l'Homme pour une exposition donnée en simulant les concentrations dans divers organes, tissus ou fluides biologiques en fonction du temps. De plus, ils pourraient permettre de prendre en compte des modifications physiologiques en fonction des populations (par exemple âge, pathologie).

3.2.5.3.4. Toxicité à doses répétées (sub-chronique)

Les études de toxicité sub-chronique sont des études *in vivo* permettant d'identifier et de caractériser le danger d'un composé. Plusieurs groupes d'animaux sont exposés quotidiennement au composé étudié *via* gavage, la nourriture ou l'eau de boisson sur une période prolongée de 90 jours. Cette durée d'exposition permet de couvrir les périodes de post sevrage, de la croissance et de la phase adulte des animaux testés. Durant la phase d'exposition et/ou au terme des 90 jours, sont réalisés chez l'animal : la mesure de l'évolution pondérale, de la consommation de nourriture et d'eau, le suivi comportemental et symptomatologique, des examens ophtalmologique, hématologique, de biochimie clinique et d'urine, une autopsie générale ainsi que de l'histopathologie. Ces études doivent être menées selon la dernière version de la ligne directrice de l'OCDE (TG 408). Cette dernière intègre par rapport à la version précédente le suivi de paramètres en lien avec les effets endocrines (cycles œstraux, dosage des hormones thyroïdiennes, etc.). L'analyse des résultats de l'étude subchronique va conditionner la mise en place de tests toxicologiques complémentaires. Dans l'optique d'obtenir l'ensemble des données nécessaires à la mise en place de ces tests

³⁷ Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance
<https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2013-01>.

complémentaires, le GT propose d'intégrer au cours de cette étude subchronique, le suivi de paramètres additionnels tels que décrits ci-dessous. Dans le cas où ces tests complémentaires ne seraient pas nécessaires, l'étude subchronique devrait permettre d'établir des points de référence toxicologique tels que la NOAEL³⁸ ou la BMDL³⁹.

- Toxicocinétique après 90 jours

Si les résultats des études de toxicocinétique après 14 jours ne rapportent pas de détection dans les organes systémiques, il est nécessaire de vérifier sur un temps plus long d'exposition (lors de l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours) le passage des barrières biologiques ainsi que la distribution des nanomatériaux.

Concernant les études de toxicocinétique après 90 jours, les mêmes attentions seront portées sur les organes à considérer en priorité (tractus gastro-intestinal, cerveau, organes de la reproduction, foie, rate et reins), les méthodes d'analyse et le niveau de base dans les contrôles négatifs.

- Dosage des nanomatériaux dans le système nerveux après 90 jours

Si les résultats des études de toxicocinétique après 14 jours ne rapportent pas de détection de nanomatériaux dans le cerveau, alors des dosages de nanomatériaux dans le système nerveux central et périphérique devront être menés après 90 jours d'exposition.

De plus, le GT souhaite préciser qu'il sera important d'effectuer les prélèvements de tissus nerveux afin de quantifier les nanomatériaux présents dans ces régions (Bolon *et al.* 2013). Le prélèvement de ces tissus ne se fera qu'après exsanguination ou perfusion des animaux (à l'aide de sérum physiologique) dans le but de s'assurer que le dosage effectué reflètera bien la quantité de nanomatériaux accumulés dans le système nerveux et pas celle présente dans le compartiment sanguin. Le cerveau, la moelle épinière mais aussi les intestins comportant une forte densité de cellules nerveuses (système nerveux entérique, Grundmann *et al.* 2015) seront prélevés, pesés, afin de déterminer par ICP-MS ou absorption atomique la quantité de nanomatériaux présente par rapport aux contrôles. Ainsi, même si l'étude est limitée à 3 mois d'exposition, durée qui pourrait être trop courte pour une translocation jusqu'au cerveau, ces prélèvements pourraient être suffisants pour révéler une accumulation de nanomatériaux dans le compartiment nerveux périphérique (Grundmann *et al.* 2015) (au niveau de la paroi intestinale) et central (moelle épinière) pouvant être prédictive d'une neurotoxicité directe par des dommages affectant les cellules nerveuses.

- Potentiel immunotoxique

Si l'immunotoxicité peut être évaluée *in vitro* sur des cellules en culture (souvent des lignées de cellules immortalisées) exposées aux nanomatériaux, la réponse immunitaire évoquée

³⁸ No observed adverse effect level ou dose sans effet nocif observable

³⁹ Benchmark dose limit

dans ces conditions se limite à des marqueurs de l'inflammation, essentiellement représentés par des cytokines de la réponse rapide et non spécifique (réponse immunitaire innée). Or, l'immunotoxicité des nanomatériaux peut se manifester sous la forme de réactions délétères tant sur la réponse innée que sur la capacité du système immunitaire (SI) à organiser à l'échelle de l'individu entier une réponse à médiation cellulaire ou humorale (réponse immunitaire adaptative) telles que l'allergie, la tolérance aux antigènes alimentaires, les réactions auto-immunes. Ces altérations sont longues à se mettre en place et requièrent *a minima* une étude orale subchronique.

Il est à noter que la ligne directrice TG 408 de l'OCDE (étude 90 jours) prévoit déjà l'étude de paramètres tenus comme indicatifs d'un impact sur le système immunitaire, tels que le poids relatif (rapport poids d'organe sur poids corporel) pour la rate et le thymus, ainsi qu'une étude histopathologique dans ces mêmes organes élargie à la moelle osseuse, l'intestin (dont les plaques de Peyer) et les nœuds lymphatiques drainant les régions concernées par la voie orale (ganglions lymphatiques mésentériques pour l'intestin) et éloignées de celles-ci (autres ganglions témoins d'effets systémiques). L'étude histopathologique des muqueuses de l'intestin permettra de révéler une infiltration neutrophilaire, la formation d'œdème et/ou d'altérations structurales. En complément de ces approches, la nature et les niveaux de sécrétion des cytokines (pro- et anti-inflammatoires) dans les muqueuses de l'intestin devront être déterminés. L'expression génique pourra compléter ces données pour permettre la mise en évidence d'un effet immunosuppresseur des nanomatériaux. Les profils de cytokines serviront d'indicateurs plus précis du potentiel immunotoxique ou immunomodulateur des nanomatériaux ingérés dans les conditions d'une exposition longue *in vivo*, dans la mise en évidence d'une réponse inflammatoire locale⁴⁰ ou d'immunosuppression capable de diminuer l'efficacité des défenses immunitaires de l'intestin. Cette approche doit être suivie dans l'étude 90 jours y compris en l'absence d'absorption des nanoparticules. En effet, la voie orale implique un potentiel de contact avec le tissu lymphoïde (*i.e.*, plaques de Peyer, comptant une prise en charge de particules par les cellules présentatrices d'antigènes) sans nécessaire accumulation locale de particules ni de passage systémique.

En plus de la caractérisation du profil de cytokines dans l'intestin, l'approche multi-niveaux devra intégrer une analyse phénotypique des cellules T dans l'intestin, les ganglions mésentériques et la rate à l'issue des 90 jours d'exposition orale au nanomatériau étudié. Une attention particulière sera portée sur la fréquence des lymphocytes T régulateurs (Treg) impliqués dans le maintien de la tolérance périphérique et la suppression des réponses immunitaires. Les Treg sont en effet capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T et la production de cytokines inflammatoires, jouant un rôle essentiel dans la prévention de l'auto-immunité (auto-tolérance) et l'homéostasie. En association avec l'immunité intestinale, les cellules Treg jouent également un rôle central dans l'induction d'une immunisation ou d'une tolérance aux aliments, l'activité suppressive étant exercée par les cytokines TGF- β et IL-10. La fréquence de cellules Treg sera évaluée sur la base de l'expression du facteur de

⁴⁰ Pour les mesures *in vivo*, une attention particulière devra être portée sur la présence de BSA (albumine de sérum bovin) dans le milieu de dispersion des nanomatériaux compte tenu du potentiel immunogène propre de cette protéine.

transcription Forkhead box P3 (FoxP3)⁴¹ spécifique de cette sous-population de cellules T. Cette mesure dans une étude 90 jours renseignera *a minima* sur le potentiel immunotoxique des nanomatériaux sur l'immunité adaptative. Si ces résultats indiquent que le nanomatériau est capable de réprimer le taux d'expression de FoxP3 utilisé comme témoin d'altération de la différenciation des lymphocytes T en cellules Treg (e.g. Bettini *et al.* 2017 pour E171), des études additionnelles devront être mises en œuvre pour caractériser la rupture potentielle de tolérance aux antigènes (voir tests complémentaires de tolérance orale).

- Biomarqueurs précancéreux du tractus gastro-intestinal

La cancérogenèse est un processus multi-étapes qui implique la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale et dont les principales étapes sont les suivantes : initiation, promotion, développement de cellules malignes et progression tumorale. Les modifications biochimiques et histologiques de la muqueuse du côlon observées au cours de ces différents stades sont aujourd'hui bien décrites. Ainsi, à l'heure actuelle, il est possible de rechercher des biomarqueurs précoces de cancérogenèse intestinale (lésion prénéoplasiques) parmi lesquels le dénombrement de foyers de cryptes aberrantes (ACF pour « aberrant crypt foci »), de cryptes accumulant la β -caténine (BCAC pour « β -catenin accumulated crypts ») et de foyers appauvris en mucine (MDF pour « mucin-depleted foci »).

Le GT tient à préciser que ces lésions prénéoplasiques peuvent apparaître spontanément et n'évoluent pas systématiquement vers la formation de tumeurs malignes. Ces lésions doivent être utilisées comme biomarqueurs précoces dans l'optique de déterminer la nécessité de mettre en place, au regard des résultats obtenus, des études de cancérogenèse.

Les ACF

Les foyers de cryptes aberrantes (ACF) ont été décrits par Bird *et al.* (1987) comme des lésions constituées de cryptes larges et épaisses au niveau du côlon de souris préalablement exposées à une substance cancérigène : l'azoxyméthane (AOM). Chez le rat, plusieurs études ont montré que la formation d'ACF augmente après exposition des animaux à des substances connues comme étant des promoteurs de la cancérogenèse. L'observation de ces ACF a également été rapportée chez des patients (Roncucci *et al.* 1991) atteints de polyposes adénomateuses familiales. Des corrélations significatives ont été mises en évidence (Takayama *et al.* 1998) entre le nombre d'adénomes observés et le nombre ainsi que la taille des foyers de cryptes aberrantes (caractérisée par le nombre de cryptes par foyer). Les résultats décrits dans la littérature suggèrent que les ACF peuvent être considérés comme des précurseurs des adénomes et des cancers. Cependant, d'autres études ont mis en lumière que certains composés comme le 2 carboxyphenyl retinamide sont connus pour favoriser le développement du cancer du côlon tout en empêchant l'occurrence des ACF (Zheng *et al.* 1999). Il a également été montré que l'acide cholique, connu comme étant un promoteur de la cancérogenèse du côlon supprime la formation des ACF alors qu'il favoriserait la formation d'un autre biomarqueur : les BCAC (Hirose *et al.* 2003). Ainsi, il apparaît que dans certains

⁴¹ Le facteur FoxP3 est impliqué dans la régulation, l'activation et la différenciation des lymphocytes T en tant que gène de contrôle principal pour le développement et la fonction des cellules Treg.

cas, d'autres biomarqueurs peuvent apparaître comme plus adaptés et plus robustes que les ACF en tant que biomarqueur d'un état précoce de la cancérogenèse du côlon.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de ligne directrice pour la mise en évidence de ces biomarqueurs. Cependant, les protocoles d'observation des ACF reposent sur une coloration au bleu de méthylène, simple de mise en œuvre. En 2017, l'Anses avait indiqué, dans son avis relatif à l'exposition alimentaire aux nanoparticules de dioxyde de titane, que le protocole employé par Bettini *et al.* (2017) avait suivi un modèle scientifiquement bien établi. Le GT souhaite préciser que l'exploitation de ces biomarqueurs et leur corrélation avec l'incidence tumorale implique d'identifier les « grands ACF ». Il ne semble pas exister de définition admise par tous d'un « grand ACF ». Bettini *et al.* ont choisi de mettre un seuil de définition d'un « grand ACF » à plus de 3 cryptes aberrantes /foyer. Pourtant, d'autres auteurs ont fixé ce seuil à 10 cryptes aberrantes (Maurin *et al.* 2006). La méthodologie mise en place pour identifier ces grands ACF devra donc être clairement décrite et argumentée.

Les BCAC

Il a été démontré, dans le cas de lésions pré-malignes du cancer du côlon, que la mutation du gène de la β -caténine et l'accumulation de cette protéine dans les cellules sont impliquées dans la formation de petites cryptes dysplasiques sur des côlons de rats préalablement exposés à l'AOM. Ces cryptes contenant des quantités excessives de β -caténine sont identifiées comme des « *β -catenin-accumulated crypts* » (BCAC). Ces dernières présentent des modifications histologiques qui se distinguent de l'apparence typique des ACF. Le nombre de cryptes par lésion semble augmenter au cours du temps après exposition à une substance cancérogène (Mori *et al.* 2004) et l'activité de prolifération cellulaire des BCAC semble plus prononcée que celle observée pour les ACF (Yamada *et al.* 2001). Au même titre que les ACF, il n'existe pas à l'heure actuelle de lignes directrices pour l'étude de ce biomarqueur, cependant différentes études ont été publiées et peuvent servir de références pour l'observation et la caractérisation des BCAC qui ne sont pas identifiés directement à la surface des muqueuses du côlon mais sont observées sur des coupes histologiques par immunohistochimie (Hata *et al.* 2004, Yamada *et al.* 2000).

Les MDF

Les foyers appauvris en mucine (MDF) ont été identifiées par Caderni *et al.* (2003) et sont également considérés comme un biomarqueur précoce de la cancérogenèse. En effet, les MDF présentent des caractéristiques dysplasiques similaires à celles observées dans les tumeurs du colon. Ces lésions ont également été observées chez des patients atteints de carcinomes colorectaux et de polyposes adénomateuses familiales (Ferna *et al.* 2008). Quelques semaines après exposition de rongeurs à l'AOM, des foyers de cryptes présentant des quantités très faibles en mucine (protéines glycosylées impliquées dans la lubrification des épithéliums) ont été observés. Des études ont montré que le nombre et la taille des MDF augmentent au cours du temps après exposition à un cancérogène (Hata *et al.* 2004). Certaines études ont mis en lumière le fait que les MDF seraient préférentiellement localisées dans la portion distale du côlon alors que les ACF seraient principalement observés dans la partie médiane du côlon (Ferna *et al.* 2005, Suzui *et al.* 2013). Les MDF sont facilement identifiables directement sur les muqueuses du côlon via des techniques de coloration à base de bleu alcian (Yoshimi *et al.* 2004).

Les durées d'expositions de 90 jours proposées pour les études sub-chroniques sont suffisantes et adaptées pour l'étude de ces trois biomarqueurs. Le choix de l'espèce animale et de la souche devra être considéré lors de l'élaboration du protocole expérimental car toutes les espèces ne présentent pas les mêmes propriétés de chimio induction (la chimio induction chez le rat F344 est plus simple de mise en œuvre que chez la souris C57).

L'analyse des biomarqueurs identifiés par le GT peut fournir des informations complémentaires. Ainsi la recherche systématique de 2 biomarqueurs est demandée pour confirmer l'apparition des lésions prénéoplasiques. Le GT estime que la recherche des BCAC présente des contraintes méthodologiques (notamment sur la nécessité d'effectuer des coupes frontales du côlon en amont de l'étape d'observation). Dans ce contexte, le GT préconise que les 2 biomarqueurs à considérer pour la recherche des lésions prénéoplasiques soient les ACF et les MDF.

3.2.5.4. Données toxicologiques complémentaires

3.2.5.4.1. Génotoxicité *in vitro* et *in vivo*

Si des résultats positifs sont obtenus dans la batterie de base de tests *in vitro* (test de mutation génique sur cellules de mammifères et test du micronoyau), toutes les données pertinentes doivent être examinées dans une approche de type Weight of Evidence (relation dose-effet, amplitude de réponse et concentration minimale positive, reproductibilité des résultats obtenus *in vitro*, spécificité de la réponse du matériau à l'échelle nanométrique, etc.). En fonction de cette évaluation, les étapes suivantes peuvent amener à une conclusion sans essais supplémentaires, ou à la nécessité de réaliser des essais *in vitro* complémentaires (dans ce cas, des modifications méthodologiques peuvent être apportées), et/ou la mise en œuvre d'essais *in vivo*.

- **Essais *in vitro* complémentaires à visée mécanistique**

Si le test des comètes ne fait pas partie de la batterie de base, il peut toutefois être utile à mettre en œuvre *in vitro*, à des fins mécanistiques dans le suivi des résultats positifs *in vitro* en particulier si les résultats préalables de toxicité *in vitro* ont montré un effet « stress oxydant » des nanomatériaux. Dans ces conditions, l'utilisation du protocole modifié (utilisation d'enzymes de réparation, *i.e.* Fpg ou hOGG1) peut mettre en évidence les lésions oxydatives de l'ADN et en évaluer le caractère exclusif ou non.

Pour démontrer un éventuel effet aneugène, il peut être nécessaire de réaliser un test du micronoyau *in vitro* couplé à la méthodologie « FISH » (Fluorescence in situ Hybridation) en utilisant par exemple des sondes pancentromériques.

- **Essais *in vivo* complémentaires**

La mise en œuvre de tests complémentaires *in vivo* peut être requise. Dans ce cas, les tests *in vivo* réalisés doivent permettre d'évaluer plusieurs paramètres de génotoxicité (« endpoints ») sur des organes cibles différents. Dans ces conditions, la combinaison des

tests *in vivo* du micronoyau et des comètes est parfaitement adaptée. Cette étude doit être menée sur des organes cibles primo-exposés (par exemple, des organes du tractus gastro-intestinal, *i.e.*, estomac, colon, etc.), le sang circulant ou des organes systémiques exposés après translocation (foie par exemple).

Le test de mutation génique sur animaux transgéniques (OCDE TG 488) réalisé sur le(s) organe(s) cible(s) peut également être d'intérêt à visée complémentaire mais comme mentionné auparavant, ce test est très long dans sa réalisation et il est très peu disponible.

En tout état de cause, des résultats négatifs obtenus sur des organes systémiques ne sont pertinents que lorsqu'il existe une preuve d'exposition.

Concernant les tests *in vivo*, ceux-ci sont généralement réalisés avec des temps de traitement relativement courts (en général pas plus de quelques jours). On peut donc s'interroger sur le design expérimental surtout concernant les organes systémiques qui ne sont exposés qu'à de très faibles quantités de nanomatériaux à chaque administration compte tenu du probable faible pourcentage à passer la barrière intestinale. Afin de pallier cette limite, le couplage des tests de génotoxicité avec les études de toxicologie à doses répétées (ou encore l'étude de toxicocinétique sur 14 jours) pourrait être envisagé.

- **Conditions expérimentales**

De nombreux points techniques et méthodologiques peuvent être à l'origine d'inconvénients rendant les tests *in vitro* sur les nanomatériaux peu prédictifs d'effet *in vivo* tels que : l'utilisation de doses très élevées (jusqu'à 2 mg/ml dans les systèmes cellulaires), les interactions possibles des suspensions de nanomatériau avec les systèmes d'essai; les interférences possibles avec les méthodes de détermination de la cytotoxicité, etc. (section 3.2.5.2).

De plus, pour s'assurer que les réponses sont qualitativement et/ou quantitativement "nanospécifiques", il serait utile de comparer la réponse en termes de génotoxicité des matériaux à l'échelle nanométrique et à l'échelle microscopique. L'inclusion de nanomatériaux positifs et négatifs de référence pourrait également présenter un intérêt particulier pour démontrer la sensibilité et la spécificité des systèmes d'essai mis en œuvre.

- **Perspectives**

Au-delà d'une proposition de stratégie à caractère réglementaire, il conviendrait de développer de nouveaux tests *in vitro* et de proposer des adaptations des tests existants pour l'évaluation de la génotoxicité des nanomatériaux.

Il serait nécessaire d'initier le processus de validation du test du micronoyau réalisé vis-à-vis d'organes cibles (colon et foie) suite à une exposition par voie orale à des nanomatériaux.

De la même façon, des versions du test *in vitro* des comètes avec un criblage à haut débit offrant la possibilité de tester de nombreux nanomatériaux rapidement et concomitamment ont été développées récemment (Nelson *et al.* 2017). La validation de ces tests permettrait leur utilisation à des fins réglementaires.

La mise en œuvre de méthodes à haut débit permettant d'étudier simultanément plusieurs paramètres (par exemple, la cytotoxicité, des biomarqueurs de génotoxicité, l'oxydation,

l'apoptose, les interactions avec les systèmes de réparation de l'ADN, etc.) pourrait être particulièrement intéressante pour le screening rapide de la toxicité de nanomatériaux. Du fait de la multiplicité des nanomatériaux utilisés, des méthodes à haut débit pourraient faciliter le screening et ainsi fournir des données utiles pour réaliser une évaluation par l'approche read-across. De la même manière, les outils de modélisation (Quantitative Nanostructure-Toxicity Relationship) devraient être développés.

Enfin, parmi ces nouveaux essais *in vitro*, des méthodes basées sur des recherches génomiques et protéomiques pourraient être utiles pour la détection d'effets liés au stress oxydatif, à l'inflammation, etc. Ces technologies peuvent également être utilisées pour définir des modes d'action, des voies de signalisation, pour évaluer les interactions entre ces différentes voies, etc. (Pfuhrle *et al.* 2013).

3.2.5.4.2. Toxicité pour le système immunitaire

- **Test de tolérance orale aux antigènes alimentaires**

La tolérance orale dépend de l'établissement d'une réponse immunitaire appropriée du tissu lymphoïde associé à l'intestin et d'un processus physiologique caractérisé par l'absence de réponse cellulaire et humorale à l'administration orale d'antigènes (tolérisation) par rapport aux mêmes antigènes administrés par voie systémique (immunisation). Les lymphocytes Treg sont un élément clef dans l'induction et le maintien d'une tolérance immunitaire aux aliments.

Si les tests requis réalisés sur une étude subchronique de 90 jours témoignent d'une incidence du nanomatériau sur la fréquence des cellules Treg (diminution significative), la mise en œuvre d'un test complémentaire *in vivo* de la tolérance orale aux antigènes alimentaires devra être envisagée.

Une étude de tolérisation orale à l'ovalbumine (OVA, un antigène alimentaire modèle) est classiquement utilisée chez le rongeur pour évaluer le potentiel délétère de xénobiotiques sur la réponse immunitaire adaptative. Différentes études ont été menées à partir de nanomatériaux tels que la silice amorphe (Toda *et al.* 2016), l'argent (Xu *et al.* 2015) ou le noir de carbone (Fine *et al.* 2016). La durée d'exposition au nanomatériau chez les rongeurs sera identique à celle mise en place pour l'étude subchronique, à savoir 90 jours. En situation physiologique, la tolérance orale se manifeste par l'absence de réponse (immunoglobulines (IgG) sériques anti-OVA) à l'administration orale de l'antigène OVA. A l'inverse, en cas de rupture dans l'induction de l'effet tolérogène, une production d'IgG sériques anti-OVA sera observée, témoin d'une intolérance à l'antigène alimentaire modèle⁴². Il n'existe pas de test dédié dans les lignes directrices de l'OCDE pour répondre spécifiquement à cette question.

- **Autres tests complémentaires**

Outre la mise en place de la tolérance orale, l'évaluation *in vivo* du potentiel immunotoxique ou immunomodulateur d'un nanomatériau sur la réponse immunitaire adaptative peut être

⁴² Pour vérifier l'intolérance, le test pourra être complété par une étude de la réponse inflammatoire dans l'intestin après une re-stimulation orale à l'OVA.

basée sur d'autres tests fonctionnels simples mettant en jeu les cellules du tissu lymphoïde de l'intestin (cellules dendritiques ou CD, macrophages, cellules T) et leur interrelations (e.g., migration des cellules présentatrices d'antigènes telles que les CD) avec celles des ganglions mésentériques et de la rate.

De premières informations sur la capacité d'un individu à développer une réponse immunitaire humorale (c'est-à-dire une réponse anticorps) à un antigène particulier pourront être obtenues en suivant les tests complémentaires d'immunotoxicité développementale décrits dans l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération de l'OCDE (EOGRTS TG n°443, section 3.2.5.4.4).

Dans le cas d'un effet significatif sur le système immunitaire sur un ou plusieurs de ces compartiments cellulaires au cours de l'étude subchronique de 90 jours (prolifération des cellules de la rate, avec analyse phénotypique des cellules T, B, NK), il pourra être envisagé des études fonctionnelles et mécanistiques pour identifier les conséquences sur la santé de l'individu (e.g., risque allergique, réactions auto-immunes, toxicité développementale sur le système immunitaire) s'appuyant notamment sur des modèles de maladies.

Il n'existe cependant pas de tests dédiés dans les lignes directrices de l'OCDE pour répondre à chacune de ces questions, les études devront donc être réalisées au cas par cas.

3.2.5.4.3. Neurotoxicité

D'un point de vue réglementaire, l'OCDE a intégré des lignes directrices pour effectuer des tests visant spécifiquement à évaluer les effets neurotoxiques des substances chimiques⁴³. Le but de ces lignes directrices est d'identifier les produits chimiques qui affectent de façon permanente ou réversible le système nerveux. Les altérations du système nerveux prises en considération sont cadrées et de fait limitées à celles qui ont été établies jusqu'à présent.

Ces lignes directrices s'appuient sur des études réalisées sur les animaux, principalement des rongeurs (OCDE 424 et 426). Plusieurs paramètres sont pris en compte, notamment :

- des observations cliniques dans la cage d'hébergement ou dans un espace dit en champ ouvert (open-field) ;
- des tests neurofonctionnels tels que ceux évaluant l'activité motrice, l'apprentissage et la mémoire ;
- ou encore des observations de neuropathologie à l'aide de tissus fixés par perfusion permettant d'estimer l'intégrité du tissu nerveux sur des bases de morphologie brute, de morphométrie et d'histopathologie.

Parmi ces paramètres, l'évaluation comportementale recommandée fait partie des tests de premier rang. En effet, les résultats des tests comportementaux sont considérés comme des critères sensibles et des plus significatifs dans l'évaluation des risques chimiques. Les performances neurocomportementales individuelles dépendent des caractéristiques de l'exposition (dose, chronicité), celles propres à l'individu (âge et état de santé général

⁴³ http://www.oecd.org/document/7/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

définissant sa vulnérabilité) et sont donc associés à une valeur prédictive ajoutée par rapport à des altérations uniquement biochimiques ou neuropathologiques par exemple.

Étant donné l'importance des tests comportementaux, et la crainte évidente que des substances chimiques puissent être classées de façon inappropriée comme neurotoxiques, la mise en œuvre de ces tests exige de répondre à plusieurs points critiques afin d'obtenir encore plus de fiabilité dans leur usage et application (Slikker *et al.* 2005). Tous les points critiques qui doivent être soigneusement pris en considération dans la planification de ces études ont été identifiés et détaillés. Force est de constater que cette rigueur fait défaut dans de nombreuses études menées en dehors de ces lignes directrices appelant ainsi à la plus grande prudence dans l'interprétation de ces données rapportées en matière de potentiels neurotoxiques.

En Europe, les études de neurotoxicité ne sont pas obligatoires, cependant, la mise en place de ces études devient nécessaire dès lors qu'il existe des indications de neurotoxicité provenant des tests réglementaires standards de toxicité à dose unique (OCDE 402, 403, 420, 423 et 425) ou à dose répétée (dont OCDE 407 et 408)⁴⁴ ou de données humaines⁴⁵. Ces lignes directrices pour les études de neurotoxicité n'ont ainsi été que rarement utilisées d'autant plus que comme pour toutes les études de toxicologie, elles sont aussi très consommatrices en ressources, en termes d'animaux, de temps et de coût global (Rovida *et al.* 2009).

De la même façon que pour tout produit chimique, il n'est raisonnable de lancer des études de neurotoxicité pour des nanomatériaux que dans des cas précis.

Actuellement, il n'y a pas possibilité de relier des signes neurologiques chez l'Homme avec une exposition à des nanomatériaux après ingestion. Dans les études expérimentales *in vivo*, il existe des indicateurs d'altérations neurologiques mis en évidence chez le rongeur après exposition à certains nanomatériaux, cependant le plus souvent les interprétations sur les liens de causalités sont limités notamment et entre autres, par manque d'information sur la pureté, la caractérisation précise des nanomatériaux employés, la voie d'exposition, les doses mises en œuvre, qui ne miment pas des conditions d'expositions réalistes transposables à celles de l'Homme. De plus, ces études suivent rarement les préconisations de mise en œuvre des tests *in vivo* et les recommandations d'interprétations des données collectées telles que décrites dans les tests réglementaires.

Dans ces conditions, il apparaît indispensable de proposer un cadre alternatif reposant sur d'autres critères de présomption de propriétés neurotoxiques visant à déterminer la nécessité de la mise en place d'études spécifiques de neurotoxicité. Un critère solide pourrait être celui de la présence de nanomatériau dans le compartiment nerveux. D'une manière générale, la translocation conduisant à une accumulation au sein du compartiment nerveux est un processus lent (Kreyling *et al.* 2017), en partie du fait de l'efficacité des barrières physiologiques propres au cerveau vis-à-vis des agents xénobiotiques, telle que la barrière hémato encéphalique, même si certaines voies d'accès comme par le nerf olfactif ou le nerf

⁴⁴ Ces tests pouvant indiquer des informations fonctionnelles et/ou histopathologiques recueillies au sein des principaux systèmes organiques, dont le système nerveux.

⁴⁵ Le plus souvent des expositions dans le cadre professionnel.

trijumeau sont reconnues (Bencsik *et al.* 2018). De plus, quantitativement parlant, la masse de nanomatériaux accumulée dans le cerveau est généralement faible (Kreyling *et al.* 2017).

Cependant, les études indiquent que la clairance des nanomatériaux dans le cerveau pourrait également être un processus très lent, favorisant de fait leur accumulation sur le long terme (Kreyling *et al.* 2017). Cette observation souligne l'importance de considérer la neurotoxicité des nanomatériaux essentiellement sur le long terme, ce questionnement étant d'autant plus pertinent que la nature du nanomatériau considéré est stable et peu soluble comme pour le TiO₂ par exemple.

En cas d'absence de données toxicologiques relatant des altérations du comportement, le premier critère simple à objectiver est la présence d'une accumulation du nanomatériau étudié au sein des tissus du système nerveux. Si le nanomatériau est détecté dans le cerveau au cours de l'étude de toxicocinétique 14 jours alors des tests complémentaires de neurotoxicité seront mis en place. En l'absence de nanomatériau dans le cerveau, il conviendra de modifier les études de toxicocinétique 90 jours en vue d'effectuer un dosage du nanomatériau dans le système nerveux (voir la section sur les études de toxicocinétique 90 jours). Cette recherche devra pouvoir être compatible avec des prélèvements et investigations histologiques de qualité. Si le nanomatériau est présent au sein du système nerveux alors des tests complémentaires de neurotoxicité devront être mis en place.

Ainsi, le facteur « accumulation de nanoparticules » dans le système nerveux central et / ou périphérique est un prérequis incontournable pour déclencher des tests de neurotoxicité, a fortiori s'il est combiné à une nature des nanomatériaux en faveur d'une bio-persistance. Ce facteur a une valeur décisive dans les calculs d'analyse de risque pour la santé, même si cette translocation au système nerveux et cette accumulation y sont très faibles

L'observation de ces critères déclenche la mise en place des études complémentaires de neurotoxicité prévues dans les lignes directrices de l'OCDE. Cependant la spécificité des propriétés typiques de cette échelle nanométrique (Bencsik *et al.* 2021) invite à prendre en considération des méthodologies et des designs expérimentaux plus pertinents.

Il serait pertinent de mettre en œuvre en parallèle quand cela est possible, une exposition par voie orale à une substance neurotoxique avérée⁴⁶ afin de s'appuyer sur un référentiel d'effet, éclairant l'interprétation et notamment pouvant distinguer un effet neurotoxique directe d'un effet toxique secondaire⁴⁷. L'existence de nombreux modèles transgéniques définissant des terrains biologiques plus sensibles pourraient également être utilement mis en œuvre, en particulier pour aborder les vulnérabilités spécifiques du système nerveux comme au cours du

⁴⁶ Ces substances à effet neurotoxique avéré pourraient être choisies en s'inspirant de la liste des critères proposés pour les tests alternatifs mis en œuvre pour la neurotoxicité développementale. Ascher *et al.* Reference compounds for alternative test methods to indicate developmental neurotoxicity (DNT) potential of chemicals: example lists and criteria for their selection and use. ALTEX (2017) 34(1).doi.org/10.14573/altex.1604201

⁴⁷ La présence de facteurs pro-inflammatoires circulants, résultant de l'atteinte d'un autre organe périphérique, pourrait initier de façon secondaire une inflammation cérébrale, avec une activation des cellules microgliales qui en cas de persistance a des implications neurotoxiques.

vieillesse. Ainsi par exemple certains modèles permettent d'étudier les processus neurodégénératifs et ce, de façon compatibles avec les lignes directrices OCDE 407 et 408.

Pour aborder la question spécifique de la neurotoxicité d'un nanomatériau, l'approche consistant à étudier la réponse d'un organisme entier est la plus pertinente. L'identification d'une perturbation comportementale, mnésique, motrice ou autres manifestations d'origine neurologique représente le marqueur le plus probant d'un effet neurotoxique. Cependant, le recueil d'observations histopathologiques, par ailleurs conseillé par les divers organismes de réglementation (Bradley *et al.* 2011), pourrait être mieux exploités notamment à l'aide de marqueurs spécifiques de l'activation des cellules gliales (Escartin *et al.* 2021) dont des plus récents comme ceux des cellules immunitaires du système nerveux (Kraft *et al.* 2011). Ces évaluations de la neuropathologie permettent d'identifier voire conforter l'évidence d'un effet neurotoxique. L'accumulation de données issues de paramètres biologiques complémentaires est souhaitée notamment en exploitant pleinement l'état de l'art actuel en neuropathologie/neurosciences (van Thriel *et al.* 2019). De façon complémentaire, il serait intéressant d'introduire une analyse histopathologique du système nerveux entérique. Dans le contexte d'une ingestion de nanomatériaux, notamment en cas d'une translocation nerveuse, il est le premier compartiment nerveux concerné dans lequel pourrait être initié des altérations d'ordre neurotoxique, bien avant le cerveau comme cela a été montré pour d'autres substances neurotoxiques ingérées⁴⁸.

- **Perspectives et évolution des études en neurotoxicité**

L'introduction de certains modèles alternatifs au rongeur, plus satisfaisant sur le plan éthique et représentant une évolution inéluctable dans les tests toxicologiques *in vivo*, offre des possibilités inédites parfaitement adaptées aux études de neurotoxicologie (Peterson *et al.* 2008). Par exemple, les batteries d'essai comportementales développées pour le poisson zèbre fournissent des évaluations tout à fait analogues aux fonctions sensorimotrices, émotionnelles et cognitives des rongeurs. Ces modèles offrent l'avantage de produire des données utiles à l'établissement d'une toxicologie prédictive, fondée sur une toxicologie mécanistique (principe des Adverse Outcome Pathways, ou AOP, pour relier les mécanismes neurotoxiques moléculaires et cellulaires au dysfonctionnement comportemental) et offrent des possibilités très prometteuses de transposer des données à l'Homme et donc ont leur place dans les études d'évaluation de risque (Vorhees *et al.* 2021).

3.2.5.4.4. Toxicité pour la reproduction et le développement

La toxicité potentielle des nanomatériaux sur les individus exposés et leur descendance sont l'objet de préoccupations du fait de leur capacité à traverser les barrières biologiques (placentaire, testiculaire, etc.).

⁴⁸ Comme pour des pesticides par exemple : Naudet N, Antier E, Gaillard D, Morignat E, Lakhdar L, Baron T, Bencsik A. Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α -Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α -Synuclein Transgenic Mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017 Dec 1;76(12):1046-1057. doi: 10.1093/jnen/nlx092.

Récemment, l'ECHA a publié une revue relative à la toxicité des nanomatériaux manufacturés sur la reproduction et le développement⁴⁹. La centaine de publications sélectionnées concernent des études *in vivo* sur la fertilité et le développement menées chez le rat et la souris après administration de nanomatériaux par voies orale et respiratoire. Le nano-TiO₂ et l'argent sont les deux nanomatériaux les plus fréquemment étudiés et représentent à eux deux près de 50 % des travaux répertoriés. Les autres nanomatériaux également étudiés sont l'oxyde de zinc, l'oxyde de silicium et les nanomatériaux à base de carbone.

Concernant la fertilité, les études se focalisent quasi exclusivement chez les mâles et mettent en lumière des conclusions contradictoires sur l'impact des nanomatériaux vis-à-vis des organes reproducteurs et de certains paramètres de la fertilité tels que le nombre, la morphologie et la mobilité des spermatozoïdes. Le document de l'ECHA indique que les études relatives à la fertilité chez les femelles sont peu nombreuses.

Les études suivant les lignes directrices de l'OCDE n'indiquent pas ou peu de préoccupations vis-à-vis de la toxicité développementale du nano-TiO₂, de l'oxyde de zinc, du dioxyde de silicium et de l'argent. Cependant, ces études limitées se sont principalement concentrées sur la toxicité pour les fœtus et leur croissance. D'autres études ne suivant pas les lignes directrices OCDE ont rapporté des effets sur le placenta ou encore sur la viabilité de la descendance. Au même titre que pour la fertilité, la disparité des résultats ne permet pas d'établir des conclusions définitives sur les nanomatériaux étudiés.

Pour certains nanomatériaux, une atteinte cérébrale avec une neurotoxicité développementale est suggérée (Amiri *et al.* 2018, Valdiglesias *et al.* 2015, Singh *et al.* 2019). Compte tenu de la vulnérabilité du cerveau en développement et du fait qu'une altération précoce du cerveau peut se répercuter chez l'adulte de façon irréversible (Cui *et al.* 2014), les études rapportant des altérations du développement, notamment au niveau du cerveau, doivent systématiquement être considérées. Ces premières indications de potentialités de toxicité neuro-développementale montrent clairement la nécessité de s'attacher à fournir des données d'évaluation neurocomportementales et neuropathologiques, notamment par une étude de durée suffisante et couvrant les stades sensibles.

De manière générale, les études considérées dans le document de l'ECHA montrent que les nanomatériaux peuvent se distribuer dans différents organes impliqués dans la reproduction et/ou le développement et que les phénomènes de distribution vont dépendre de la nature chimique et de la taille de ces nanomatériaux.

Concernant la toxicité sur la reproduction et le développement, les études subchroniques sur 90 jours se limitent aux effets sur les organes de la reproduction et le cycle œstral. Les effets sur la fertilité, la conception, la gestation et le développement d'organes et de fonctions (dont neurologiques) seront étudiés dans des tests complémentaires si une exposition systémique est démontrée lors des études de toxicocinétique et/ou si des atteintes histomorphologiques sont observées au niveau des organes de la reproduction.

Différentes lignes directrices ont été élaborées pour l'étude sur la reproduction et le développement.

Ces différentes études sont listées et décrites dans le document guide de l'EFSA (2018). Brièvement, ces études intègrent des tests de toxicité pour le développement prénatal (OCDE

⁴⁹ ECHA 2020 : A critical review of studies on the reproductive and developmental toxicity of nanomaterials

TG 414) ainsi qu'une étude de toxicité pour la reproduction étendue sur une génération (EOGRTS OCDE TG 443) avec exploration spécifique de cohortes d'animaux pour effectuer des essais de toxicité pour la reproduction et le développement (cohorte 1), des essais de neurotoxicité pour le développement (cohorte 2). Préalablement à l'essai EOGRTS, une étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement (OCDE TG 422) peut être réalisée. Concernant les études spécifiques au neurodéveloppement, la ligne directrice OCDE 426 peut aussi être envisagée.

• Perspectives

Dans le document de l'ECHA relatif à la toxicité de nanomatériaux manufacturés sur la reproduction et le développement, différentes propositions et recommandations ont été formulées. En plus de la nécessité de générer des données manquantes sur la reproduction et le développement, des recommandations méthodologiques ont été proposées. Le GT est en accord avec ces recommandations rappelées brièvement ci-dessous et précise certains éléments :

- Chez la femelle, l'absorption et la distribution des nanomatériaux vers les différents organes risquent de considérablement varier au cours du cycle œstral et durant la gestation, ainsi les périodes d'exposition des animaux traités doivent intégrer ces considérations.
- Pour la période post-natale, les études de toxicité pour le développement doivent considérer la fertilité de la descendance ainsi que la fonction d'autres organes (neurologique, cardiovasculaire, immunitaire).
- Les études de toxicité pour la reproduction et le développement doivent respecter autant que possible les lignes directrices de l'OCDE.
- Des études relatives au passage des nanomatériaux à travers des barrières biologiques (placenta, barrière testiculaire) devront être menées en amont, lors des études ADME, en se basant sur des méthodes analytiques sensibles permettant de quantifier et de différencier les matériaux nanométriques des matériaux non nanométriques.

3.2.5.4.5. Cancérogenèse

Les nanomatériaux sont susceptibles d'induire des effets cancérogènes de par leur structure, leur éventuel potentiel à interagir avec l'ADN et/ou l'appareil mitotique, à générer des réactions inflammatoires et à s'accumuler dans certains organes. Par inhalation, certains nanomatériaux ont été classés comme cancérogènes potentiels. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé les nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT) Mitsui-7 (Mitsui, Tokyo, Japon) comme possiblement cancérogènes pour l'homme (2B). Certaines études montrent que, si la probabilité de présenter une activité cancérogène dépend de la composition du matériau, d'autres caractéristiques physico-chimiques (notamment taille, morphologie)

pourraient *per se* avoir une influence significative sur l'accélération du processus néoplasique et donc jouer un rôle additionnel dans les mécanismes de pathogenèse.

Il n'existe que très peu d'études de cancérogenèse disponibles dans la littérature, en particulier par voie orale. Pour autant, l'évaluation du potentiel cancérogène d'un nanomatériau ne doit pas être systématique (lourdeur, durée, éthique) mais justifiée.

L'évaluation du potentiel cancérogène du nanomatériau n'est requise qu'en cas d'observation de lésions tissulaires associées à de possibles effets cancérogènes (inflammation, prolifération, etc.) et/ou en cas d'une accumulation du nanomatériau dans des organes systémiques dans les études de toxicité à doses répétées de 90 jours ou au cours des essais de toxicocinétique. De la même façon, s'il y a apparition significative de biomarqueurs précancéreux au niveau d'organes du tractus gastro-intestinal, une étude de cancérogenèse est également requise.

Pour rappel, si le nanomatériau fait partie d'une catégorie (définie après grouping /read across) pour laquelle un ou plusieurs analogues sont connus pour présenter une activité cancérogène, une étude de cancérogenèse est alors indispensable. En revanche, si l'évaluation préalable du potentiel génotoxique met en évidence une activité génotoxique intrinsèque significative dans des études réalisées chez l'animal, la probabilité d'un potentiel cancérogène du nanomatériau étant très élevée, il n'est *a priori* pas utile de réaliser une étude complète de cancérogenèse, le nanomatériau étant alors considéré *de facto* comme possiblement cancérogène.

La recherche d'une activité cancérogène peut être réalisée selon les recommandations de la ligne directrice 451 de l'OCDE (2009)⁵⁰ ou en réalisant une étude combinée selon les recommandations de la ligne directrice 453 de l'OCDE (2009)⁵¹ sans nécessairement y apporter des adaptations. L'étude est réalisée sur une espèce, généralement le rat. L'étude de cancérogénicité chez une seconde espèce peut être requise si les résultats obtenus dans la 1^{ère} espèce sont équivoques (ou éventuellement spécifiques à l'espèce) ou si des observations provenant d'autres études tendent à évoquer une possible activité cancérogène chez une autre espèce.

- **Perspectives**

- Méthodes *in vivo*

Des études plus courtes utilisant des animaux transgéniques (incluant des modèles sur-exprimant ou ayant un oncogène activé, déficients en gène suppresseur de tumeur ou en gène de réparation de l'ADN etc.) peuvent être envisagées. Cependant, ces modèles n'ont pas été

⁵⁰ OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2009. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 451: Carcinogenicity studies. OECD Publishing, Paris, France, 15 pp.

⁵¹ OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2009. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 453: Combined chronic toxicity/carcinogenicity studies. OECD Publishing, Paris, France, 20 pp.

validés au cours d'essais inter laboratoires et ne disposent pas de lignes directrices, ils ne peuvent donc être réalisés qu'en seconde intention.

- Méthodes *in vitro*

S'il peut paraître à ce jour prématuré d'envisager la suppression totale des expérimentations animales, pour des raisons éthiques et dans un contexte réglementaire évolutif intégrant les notions de bien-être animal, il est probable que l'on remplace les essais sur animaux aux fins de l'évaluation des risques, de l'établissement des priorités et de la classification par une ou plusieurs des méthodes ne faisant pas appel à des essais *in vivo*. Étant donné que la plupart de ces méthodes alternatives ne peuvent être utilisées seules, il sera nécessaire de les intégrer dans une stratégie d'essai dite intégrée (ITS) qui est basée sur des méthodes de pondération des preuves intégrant plusieurs sources d'informations indépendantes (regroupement et lecture croisée, seuils de préoccupation toxicologique, preuve fondée sur l'exposition et méthodes informatiques (SAR, QSAR, PBPK) et des tests *in vitro*), ainsi que des informations sur le mode et/ou les mécanismes d'action.

Dans cette optique, le test de transformation cellulaire (Cell Transformation Assay, CTA) a été proposé comme une alternative possible aux modèles animaux. Ce test vise à étudier le potentiel cancérigène basé sur certaines preuves expérimentales selon lesquelles les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans la transformation cellulaire *in vitro* semblent être similaires à ceux qui soutiennent la cancérogenèse *in vivo*, et se produisent à la suite d'une réponse cellulaire complète aux lésions directes et indirectes de l'ADN (Combes *et al.* 2007, Corvi et Vanparys 2012, Lilienblum *et al.* 2008 ; Mascolo *et al.* 2010 ; Rohrbeck *et al.* 2010 ; Vanparys *et al.* 2012 ; Vasseur et Lasne 2012). Des guides techniques de ce test sur les cellules SHE, BALB/c 3T3 et Bhas 42 ont été publiés par l'OCDE.

Le CTA mesure la transformation morphologique des cellules, sous forme de colonies transformées ou de foyers dérivés d'une seule cellule. Plusieurs modèles ont été développés et mis en œuvre depuis le début des années 60, les 3 principaux étant résumés ci-après.

- Les cellules d'embryon de hamster syrien (SHE) ont été les premières utilisées pour mettre en place un modèle d'étude de la transformation cellulaire *in vitro*. Ce sont des cellules primaires normales métaboliquement, diploïdes, et p53-compétentes, qui conservent la capacité de biotransformer une large gamme de xénobiotiques, comme en témoignent des études avec des substances nécessitant une activation métabolique (OCDE ENV/JM/MONO(2015)18). Récemment, le test CTA sur SHE a été présenté comme un outil prometteur pour l'identification de composés cancérigènes non génotoxiques (Colacci *et al.* 2014).
- Le modèle utilisant des fibroblastes embryonnaires de souris BALB/c 3T3 a été le premier modèle à être développé en utilisant des lignées cellulaires établies. Le test CTA sur BALB/c 3T3 peut être réalisé en utilisant le protocole standard, qui a été validé par l'ECVAM et inclus dans la liste des méthodes pour REACH (méthode B-21), ou un protocole modifié pour réduire la cytotoxicité et améliorer la spécificité du test (Vaccari *et al.* 1999).

- Les cellules Bhas 42 sont issues des cellules BALB/c 3T3 A31-1-1 transfectées avec un plasmide contenant le gène v-Ha-ras (Sasaki *et al.* 1988). Comme ces cellules expriment un oncogène v-Ha-ras activé, elles sont considérées comme des cellules déjà initiées, selon le paradigme en deux étapes de la cancérogenèse génotoxique (Sasaki *et al.* 2015).

Tous les modèles de CTA fournissent un critère de transformation maligne facilement détectable. Cependant, la subjectivité dans l'identification des foyers ou des colonies morphologiquement transformées a souvent été indiquée comme l'une des principales limites des CTA (Corvi *et al.* 2017). De plus, l'une des principales critiques qui empêche l'utilisation du CTA comme test autonome dans un contexte réglementaire, repose sur le manque d'informations mécanistiques permettant de comprendre les événements clés conduisant à l'oncotransformation (Mascolo *et al.* 2018). Pour surmonter cette limitation et améliorer l'utilisation de ce test dans la stratégie intégrée de test de la cancérogenèse, il est utile de combiner ce test avec une approche transcriptomique, pour mettre en évidence les étapes moléculaires conduisant à la transformation maligne *in vitro* (Mascolo *et al.* 2018). De même, récemment, le couplage du CTA avec l'analyse de méthylation de l'ADN pour la détection des cancérogènes non génotoxiques a été préconisé (Hwang *et al.* 2020).

Par ailleurs, la décision de ne pas effectuer de tests de cancérogenèse sur la base de résultats de tests de génotoxicité négatifs crée un vide réglementaire pour l'identification des substances cancérogènes agissant selon un mode d'action non génotoxique (cancérogènes épigénétiques). Ainsi, le développement d'approches intégrées (IATA, Integrated Approaches for Testing and Assessment) incluant une combinaison de méthodes *in vitro* (telles que « omiques ») et *in silico* (comme des QSARs) a été proposé récemment pour évaluer l'activité cancérogène non génotoxique (Jacobs *et al.* 2020). Des événements clés, impliqués dans des AOP (Adverse Outcome Pathways), ont été identifiés pour certains types de cancer (colon, vessie et sein (Jacobs *et al.* 2020)). L'exploration de la caractérisation moléculaire de la cancérogenèse colorectale à l'aide d'approches globales de biologie des systèmes a été considérée comme prometteuse (Maglietta *et al.* 2012).

3.2.6. Etape 4 : caractérisation du risque des nanomatériaux manufacturés

Ce guide scientifique et technique propose une méthodologie séquentielle dans l'optique de fournir les données essentielles à la caractérisation du risque des nanomatériaux manufacturés. La caractérisation du risque des nanomatériaux manufacturés repose sur la même démarche que celle employée pour la caractérisation du risque des substances dites conventionnelles. Cette démarche repose sur l'exploitation et la confrontation des données issues des calculs d'exposition et de caractérisation du danger. Tel que rappelé dans le document guide de l'EFSA (2018), la bonne conduite de la caractérisation du risque requiert idéalement la mise en place d'une évaluation du poids de la preuve dans l'optique d'évaluer la pertinence et la qualité des données collectées à chacune des étapes de l'évaluation du

risque. Une analyse critique sur les approches d'évaluation des niveaux de preuve à l'étape d'identification des dangers a été publiée par l'Anses en 2016⁵².

3.3. Conclusions et recommandations du GT nano et alimentation et du CES ERCA

3.3.1. Conclusions

Le GT « nano et alimentation » propose un guide scientifique et technique décrivant une méthodologie d'évaluation du risque adaptée aux nanomatériaux manufacturés utilisés dans les denrées alimentaires. Ce document ne fait pas office de lignes directrices ni de réglementation. En 2018, l'EFSA a proposé un guide dédié à l'évaluation du risque en lien avec les applications des nanosciences et des nanotechnologies dans le domaine de l'alimentation humaine et animale. Les principaux concepts d'évaluation du risque proposés par les panels d'experts de l'EFSA et de l'Anses sont proches, néanmoins certaines différences méthodologiques ont été mises en lumière au sein de ce document et sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Thématique	EFSA 2018	Anses 2021	Argumentaires
Définition des nanomatériaux	Le guide de l'EFSA considère différentes définitions existantes telles que : la définition de nanomatériau manufacturé (règlements 2015/2283 et 1169/2011) et la recommandation de définition de la CE pour les nanomatériaux (2011/696/EU).	Le GT a établi dans son précédent avis publié en 2020 sa propre qualification du terme nanomatériau manufacturé (voir section 3.2.2). Cette qualification n'a pas de valeur réglementaire.	Afin de considérer l'ensemble des additifs alimentaires présentant une fraction nanométrique et/ou des propriétés typiques de la nano-échelle, le GT propose sa propre qualification. En particulier, les notions d'intentionnalité et de seuil de 50% en nombre de particules n'ont pas été jugées pertinentes avec les travaux du GT.
Mesure de la taille des particules	L'EFSA propose l'utilisation de différentes techniques pour la mesure de la taille, l'une d'elle étant systématiquement la microscopie électronique (ME). Si l'observation en ME n'est pas possible, des techniques d'imagerie alternatives peuvent être utilisées. D'autres techniques telles que la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la sédimentation par	Le GT estime que seule la microscopie électronique (ME) doit être utilisée pour les mesures de la taille des particules constitutives des nanomatériaux manufacturés. Le GT recommande de systématiquement coupler les observations en ME avec de l'analyse	Le GT recommande l'utilisation de la ME car cette technique est la plus adaptée et la plus robuste pour déterminer la taille et la morphologie des particules constitutives. Les observations en ME permettent également de distinguer les particules isolées de celles engagées au sein

⁵² Saisine de l'Anses n° 2015-SA-0089 : avis relatif au rapport d'étape sur l'évaluation du poids des preuves à l'Anses : revue critique de la littérature et recommandations à l'étape d'identification des dangers.

	centrifugation en phase liquide (CLS) sont également proposées.	dispersive en énergie (EDX) afin de limiter l'observation d'artefacts.	d'agrégats et d'agglomérats.
Dissolution des nanomatériaux dans les conditions du tractus gastro-intestinal	L'EFSA considère que si moins de 12% en masse du matériau de départ est présente sous forme nanoparticulaire après 30 minutes d'incubation dans des conditions mimant celles du tractus gastro-intestinal, alors l'ERS ne nécessite pas la mise en place d'une approche dite « nanospécifique ».	Le GT n'a pas retenu le seuil de 12% proposé par l'EFSA. Le GT propose deux stratégies analytiques alternatives (voir section 3.2.3) permettant d'évaluer la présence de particules via une approche ME-EDX après 2h d'incubation dans des conditions de pH balayant les valeurs extrêmes observées dans le tractus gastro-intestinal (pH1 et 7).	La détermination du seuil de 12% en masse et du temps d'incubation reposent sur les notions de demi-vie et de temps de passage de la barrière intestinale (BI). Le GT estime que les demi-vies des nanomatériaux et les temps de passage de la BI sont très variables du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques différentes et du milieu environnant.
Dissolution des nanomatériaux dans les conditions lysosomales, persistance et accumulation intracellulaire	Au même titre que pour le tractus gastro-intestinal, un seuil de dissolution (12% en masse après 72h d'incubation) est également proposé dans le compartiment lysosomal. En dessous de ce seuil et en l'absence de toxicité observée via la batterie de tests <i>in vitro</i> proposée, la poursuite de l'ERS nanospécifique n'est plus nécessaire.	Le GT n'a pas considéré les phénomènes de dissolution en conditions lysosomales au sein de sa méthodologie d'ERS nanospécifique.	Les phénomènes de dissolution en condition lysosomale n'ont pas été retenus car : la méthodologie d'analyse est peu décrite, des organelles autres que le lysosome peuvent être exposés aux nanomatériaux, d'autres voies d'internalisation cellulaire peuvent être sollicitées ainsi que d'autres voies de translocation ne justifiant pas d'une internalisation dans les cellules (voie paracellulaire)
Identification et quantification des nanomatériaux dans l'alimentation	La recherche des nanomatériaux dans les aliments est appliquée dès les premières étapes de la méthodologie pour confirmer ou infirmer la mise en place d'une ERS nanospécifique. Cette recherche est également mise en place pour le calcul des niveaux d'exposition.	La recherche des nanomatériaux et leur dissolution dans les aliments ne sont pas considérées comme des critères de décision pour la mise en place d'une ERS nanospécifique. Le GT estime que la présence des nanomatériaux dans les aliments peut être déduite précocement et rapidement lors des étapes 1 et 2 proposées dans ce document.	La présence de particules appartenant à la nano-échelle dans les aliments dépend notamment des propriétés physico-chimiques et de la complexité des matrices alimentaires. Au vu de cette complexité et de la multiplicité des nanomatériaux manufacturés utilisés dans le domaine de l'alimentation, la recherche des particules appartenant à la nano-échelle dans les denrées alimentaires ne peut pas être exhaustive.
Identification et caractérisation du danger	Les méthodologies d'identification et de caractérisation du danger proposées par l'EFSA et l'Anses sont proches et reposent sur une approche séquentielle (tiered approach). Les résultats observés lors des études <i>in vitro</i> , de toxicocinétique et subchroniques vont		

	<p>conditionner la mise en place d'études complémentaires approfondies. Les principales différences relevées par le GT sont résumées ci-dessous :</p> <ul style="list-style-type: none"> • L'étape de persistance et d'accumulation intracellulaire (dissolution dans les lysosomes) n'est pas retenue par le GT (voir explications ci-dessus). • La mise en place des études de cancérogenèse dans le guide de l'EFSA n'est pas clairement explicitée. Le GT propose la recherche systématique des biomarqueurs précancéreux au niveau du tractus gastro-intestinal lors de l'étude sub-chronique de 90 jours. Indépendamment des expositions systémiques, des effets nocifs locaux au niveau du tractus gastro-intestinal peuvent apparaître via des mécanismes non génotoxiques. Ainsi, l'observation précoce et systématique de biomarqueurs précancéreux conditionne la mise en place d'études complémentaires de cancérogenèse. • L'EFSA mentionne dans son guide la possibilité de mettre en place des études relatives à l'identification des effets des nanomatériaux sur le microbiote. Ces études ne sont pas, à ce stade, retenues par le GT. En effet, Il n'existe pas à l'heure actuelle de lignes directrices ou de protocoles représentatifs pour évaluer la complexité du microbiote tel que cela est mentionné dans le guide de l'EFSA. De plus, les difficultés d'interprétation des résultats ne permettent pas d'exploiter efficacement ce type d'études au sein d'une ERS. Des études ont déjà été réalisées sur l'interaction de certains nanomatériaux (dioxyde de titane⁵³, oxyde de zinc⁵⁴, argent⁵⁵) avec les bactéries de la flore intestinale (internalisation, croissance bactérienne, composition phylogénétique, etc) et le mucus intestinal. Si certaines de ces études ont notamment été considérées au sein de l'avis de l'Anses de 2019 relatif à la mise à jour des données toxicologiques du E 171, elles n'ont pas été menées <i>in vivo</i> mais sur des systèmes d'essai <i>in vitro</i> comprenant quelques souches bactériennes qui ne représentent ni l'exhaustivité ni la complexité du microbiote intestinal chez l'Homme.
--	--

3.3.2.Recommandations et perspectives

L'objectif du GT était, à travers ce guide scientifique et technique, de proposer des concepts et des méthodologies pragmatiques et applicables au contexte de l'évaluation du risque. Cependant, certains défis méthodologiques et techniques doivent encore être relevés concernant la caractérisation physico-chimique des nanomatériaux manufacturés, la détermination des niveaux d'exposition des consommateurs à ces nanomatériaux ainsi que l'identification et la caractérisation de leurs dangers.

Recommandations relatives à la caractérisation physico-chimique

Des recommandations en lien avec la caractérisation physico-chimique des nanomatériaux ont été formulées dans l'avis de l'Anses publiés en 2020 et sont rappelées ci-dessous.

⁵³ Z. Chen, S. Han, D. Zhou, S. Zhou, G. Jia. Effects of oral exposure to titanium dioxide nanoparticles on gut microbiota and gut-associated metabolism *in vivo*. *Nanoscale*, 2019,11, 22398-22412.

⁵⁴ T. Xia , W. Lai, M. Han, M. Han, X. Ma, L. Zhang. Dietary ZnO nanoparticles alters intestinal microbiota and inflammation response in weaned piglets. *Oncotarget*, 2017;8(39):64878-64891.

⁵⁵ L.A. Wilding, C. M. Bassis, K. Walacavage, S. Hashway, P. R. Leroueil, M. Morishita, A. D. Maynard, M. A. Philbert, I. L. Bergin. Repeated dose (28 day) administration of silver nanoparticles of varied size and coating does not significantly alter the indigenous murine gut microbiome. *Nanotoxicology*. 2016; 10(5): 513–520.

Brièvement, le GT rappelle que la microscopie électronique est à l'heure actuelle la technique la plus appropriée pour déterminer la taille et la morphologie des nanomatériaux. Néanmoins, cette technique d'observation ne présente pas les mêmes avantages que la DLS (diffusion dynamique de la lumière) ou la sp-ICP-MS (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif sur particule unique) en termes de débit d'analyse. Ainsi, des optimisations doivent être apportées notamment concernant l'acquisition et le traitement d'images afin d'adapter au mieux la microscopie électronique à des mesures de routine.

Si la microscopie électronique est la seule méthode actuellement recommandée par le GT, ce dernier souligne l'existence d'initiatives mettant en jeu l'intelligence artificielle visant à automatiser l'analyse et le recoupement de données issues de techniques différentes dans un contexte de robustesse métrologique. Ces initiatives pourraient à terme permettre de caractériser plus facilement les nanomatériaux. Le GT encourage les travaux allant dans cette direction.

Le GT a intégré dans sa méthodologie d'évaluation du risque les propriétés de dissolution des nanomatériaux dans les conditions du tractus gastro-intestinal. Bien que des travaux exploratoires, mimant les conditions physiologiques à des degrés de complexités diverses, aient déjà fait l'objet de publications, il n'existe pas à l'heure actuelle de conditions d'essai standardisées permettant d'évaluer la dissolution de ces nanomatériaux dans les conditions du tractus gastro-intestinal. Dans ce contexte, le GT recommande la mise en place de travaux visant à développer une ou des méthodes de référence adaptées à l'étude des nanomatériaux dans les fluides gastro-intestinaux.

Les biomolécules présentes dans les denrées alimentaires ou les fluides biologiques ont la capacité de s'adsorber à la surface des nanomatériaux pour former un enrobage (ou corona). Cette corona peut modifier la chimie et la charge de surface des particules et peut donc avoir un impact sur le devenir *in vivo* des nanomatériaux. Le GT recommande donc la mise en place d'études permettant de caractériser la formation des corona à la surface des nanomatériaux.

Recommandations relatives aux calculs des niveaux d'exposition

Les calculs d'exposition des consommateurs à la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés considèrent différents paramètres tels que les niveaux de consommation des différentes catégories alimentaires, les niveaux de concentration des nanomatériaux au sein de ces catégories et enfin la fraction massique des particules appartenant à la nano-échelle.

Concernant les données de consommation, le logiciel FAIM utilisé pour déterminer les niveaux d'exposition aux additifs alimentaires prend en compte les données françaises issues des études INCA2. Le GT recommande d'utiliser à l'avenir les données mises à jour au cours de l'étude INCA3.

Concernant les mesures des niveaux de concentration des nanomatériaux au sein des denrées alimentaires, le GT rappelle que les nanomatériaux présentent des propriétés

physico-chimiques complexes qui requièrent l'utilisation de protocoles et de techniques analytiques adaptés. En amont de l'étape de quantification de l'additif alimentaire et/ou d'observation des particules, l'étape d'extraction des nanomatériaux de leurs matrices alimentaires présente certaines difficultés. Ainsi, des protocoles d'extractions doivent être élaborés, optimisés et adaptés à la nature et à la complexité des matrices alimentaires. A titre d'exemples, des études ont déjà porté sur l'extraction de nanomatériaux en milieu alcalin (Ojeda *et al.* 2020), par hydrolyse enzymatique (Taboada-López *et al.* 2019) ou encore via l'utilisation de particules magnétiques (Luo *et al.* 2020).

La détermination de la fraction massique des particules appartenant à la nano-échelle doit être réalisée à partir d'un échantillonnage représentatif qui devra considérer, pour un même nanomatériau, la variabilité des différents lots disponibles sur le marché. Le calcul de la fraction massique pouvant être effectué via différentes méthodologies, le GT recommande la mise en place d'une approche harmonisée pour le calcul de la fraction massique des particules appartenant à la nano-échelle.

Le GT recommande également la mise en place de campagnes de mesure des nanomatériaux manufacturés utilisés en tant qu'additifs alimentaires dans les catégories alimentaires identifiées au cours de la première phase d'expertise de cette saisine⁵⁶.

Recommandations relatives à l'identification et la caractérisation du danger

Différentes évolutions et perspectives ont été proposées par le GT tout au long de ce guide notamment concernant l'identification et la caractérisation du danger. En effet, l'évolution des connaissances et des méthodes analytiques, la nécessité de réduire les tests sur les animaux, le développement de la toxicologie prédictive et mécanistique ainsi que le développement d'outils et d'appareillages offrant un haut débit d'analyses ouvrent de nouvelles possibilités qui conduiront à l'évolution des méthodologies d'évaluation du risque dans les prochaines années.

Certaines évaluations toxicologiques n'ont pas été retenues au sein de ce guide, notamment les études relatives au microbiote intestinal (voir les détails dans le tableau au paragraphe conclusion). Dans l'optique d'intégrer les effets potentiels des nanomatériaux sur le microbiote intestinal dans une méthodologie d'évaluation du risque nanospécifique, un important travail de recherche doit être mené. Il devra permettre d'optimiser et d'harmoniser des tests afin de les adapter à l'évaluation des effets des nanomatériaux sur le microbiote intestinal. Parallèlement, il sera également nécessaire de mieux comprendre l'influence des modifications du microbiote (*i.e.*, dysbiose) sur la santé humaine et d'améliorer le traitement des données massives issues de ce type d'études⁵⁷. Néanmoins, les études d'exposition sub-chronique de 90 jours aux nanomatériaux proposées par le GT peuvent apporter des connaissances relatives à l'impact de ces substances sur la composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal (analyse de la composition par séquençage 16S,

⁵⁶ <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2016SA0226Ra.pdf>

⁵⁷ La nécessité de mise en place des études sur le microbiote ne sont pas spécifiques au cas des nanomatériaux

production de métabolites tels des acides gras à chaînes courtes), notamment pour les nanomatériaux présentant des activités biocides (Lamas *et al.* 2020).

Par ailleurs, en raison de la propension de certains nanomatériaux à traverser le placenta et à s'accumuler dans le méconium (*i.e.*, les premières selles du nouveau-né), traduisant une imprégnation *in utero* chez l'Homme (Aengenheister *et al.* 2021; Guillard *et al.* 2020), les études de toxicologie du développement chez l'animal pourront aussi intégrer une analyse du microbiote intestinal chez la descendance exposée *in utero*. De telles informations pourront étayer de nouveaux processus d'évaluation du risque nanospécifique pour répondre aux préoccupations sur de potentiels effets délétères sur la descendance, notamment en raison de l'importance des interactions bactéries-cellules immunitaires pour le développement et la maturation des fonctions immunitaires, entre autres fonctions physiologiques (Lamas *et al.* 2020).

Enfin, Il n'existe pas à l'heure actuelle de données épidémiologiques dans le cas spécifique de la voie orale. Le dispositif EPI nano porté par Santé Publique France a été mis en place en 2014 pour la surveillance épidémiologique des travailleurs potentiellement exposés aux nanomatériaux manufacturés. Le GT estime qu'il serait pertinent de s'inspirer de la mise en place d'un tel dispositif afin de constituer une base de réflexion à de futures études épidémiologiques dédiées à l'exposition des consommateurs aux nanomatériaux manufacturés par voie orale.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du GT nano et alimentation et du CES ERCA.

Cet avis est le résultat d'une seconde phase de l'expertise de l'Anses concernant l'étude des nanomatériaux dans l'alimentation. La première phase de l'expertise (avis Anses 2020) avait investigué les débats et controverses en lien avec l'usage des nanomatériaux, l'identification des nanomatériaux manufacturés utilisés en tant qu'additifs alimentaires et additifs technologiques dans les matériaux au contact des denrées alimentaires ainsi que l'identification des catégories alimentaires pouvant contenir ces nanomatériaux. Enfin, les premiers éléments méthodologiques permettant d'orienter l'évaluation du risque vers une approche standard ou nanospécifique avaient été proposés.

Ce second avis comporte un guide scientifique et technique dont l'objectif est de proposer une méthodologie d'évaluation du risque adaptée à la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés utilisés en tant qu'additifs alimentaires. Cette évaluation du risque nanospécifique est donc applicable uniquement à des expositions par voie orale et se décline en plusieurs étapes selon la séquence suivante : identification des nanomatériaux manufacturés, caractérisation de leur propriété de dissolution, calcul des niveaux d'exposition, identification et caractérisation du danger et enfin caractérisation du risque. S'agissant d'ailleurs de la caractérisation du danger, ce guide souligne des défis méthodologiques importants (maîtrise de la dispersion, dosimétrie aux organes, pertinence de certains protocoles établis, etc.) et discute les résultats qui peuvent être obtenus avec différents protocoles expérimentaux en usage.

En 2018, l'EFSA avait proposé un guide technique pour l'évaluation du risque des applications relatives aux nanosciences et nanotechnologies utilisées dans le domaine de l'alimentation humaine et animale. La méthodologie développée par le GT nano et alimentation repose sur les mêmes fondements que ceux développés par le panel d'experts de l'EFSA : les résultats des études systématiques *in vitro*, de toxicocinétique et de toxicité subchronique vont conditionner la mise en place de tests toxicologiques complémentaires approfondis et ciblés. Cependant, l'Anses propose par ce guide un paramétrage différent pour certains aspects : l'applicabilité de la proposition de définition réglementaire européenne, les mesures de la taille des particules, les propriétés de dissolution, les calculs d'exposition à la fraction nanométrique et certains paramètres d'identification du danger. S'agissant de la proposition de définition, l'agence souligne d'ailleurs qu'elle a répondu à la consultation publique lancée par la Commission européenne en prévision d'une éventuelle révision en insistant sur le besoin de son évolution. Un avis est en préparation pour 2022 en vue d'explicitier la position que l'Anses a défendu dans cette consultation.

La prochaine phase de l'expertise consistera en une mise en application de la méthodologie établie par le présent avis afin de mener, en fonction des données disponibles, une évaluation du risque nanospécifique de nanomatériaux manufacturés identifiés au cours de la première phase de l'expertise (avis Anses 2020). Il importe de noter à ce sujet qu'en 2021, et dans le cadre d'une mise à jour de l'évaluation du risque sur base de nouvelles données, l'EFSA a formulé un avis⁵⁸ estimant que l'emploi du dioxyde de titane ne peut plus être considéré comme sûr en tant qu'additif alimentaire, du fait notamment que des effets génotoxiques ne peuvent être exclus.

Dans l'attente de la finalisation de l'expertise engagée et compte tenu des incertitudes sur les risques que représentent les nanomatériaux dans l'alimentation, l'Anses rappelle et actualise les recommandations émises au cours des différentes expertises menées à ce sujet depuis 2006, à savoir, notamment, la nécessité de :

- développer des méthodologies analytiques et toxicologiques adaptées à l'évaluation du risque sanitaire des nanomatériaux ;
- limiter l'exposition des travailleurs, des consommateurs et de l'environnement dans le cadre d'une approche graduelle, notamment en favorisant l'utilisation de produits sûrs, dépourvus de nanomatériaux, et équivalents en termes de fonction, d'efficacité et de coût ;
- renforcer la traçabilité des produits de consommation contenant des nanomatériaux, essentielle aux travaux d'évaluation des risques. L'Anses appelle à une amélioration des déclarations dans le cadre du portail national R-nano afin de permettre une meilleure description des nanomatériaux mis sur le marché, de leurs usages et des expositions qui leurs sont associées

⁵⁸ Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive; EFSA Journal 2021;19(5):6585.

L'évaluation du risque adaptée à la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés, notamment ceux utilisés en tant qu'additifs alimentaires soulève des défis méthodologiques et techniques qui doivent être relevés. L'Agence souligne la nécessité de conduire, dès que possible, des études de caractérisations physico-chimiques, via des approches de microscopie électronique, pour les nanomatériaux manufacturés suspectés identifiés dans la première phase de l'expertise. Cette caractérisation physico-chimique (notamment la mesure de la taille et de la distribution granulométrique) est une étape indispensable pour une évaluation du risque de ces nanomatériaux.

De même, l'Anses appuie les recommandations du GT relatives à la standardisation des conditions d'essais concernant la caractérisation physico-chimique, les calculs d'expositions et les études toxicologiques dans l'optique de générer des données adaptées et exploitables dans le cadre d'une évaluation du risque des nanomatériaux manufacturés.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Alimentation, méthodologie, nanomatériaux manufacturés, évaluation du risque sanitaire.

Food, methodology, manufactured nanomaterials, risk assessment.

CITATION SUGGEREE

Anses. (2021). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à un guide d'évaluation du risque sanitaire spécifique aux nanomatériaux dans les produits destinés à l'alimentation (saisine 2016-SA-0226). Maisons-Alfort : Anses, 86 p.

BIBLIOGRAPHIE

Aengenheister L., Favaro R.R., Morales-Prieto D.M., Furer L.A., Gruber M., Wadsack C., Markert U.R., Buerki-Thurnherr T. Research on nanoparticles in human perfused placenta: State of the art and perspectives. *Placenta*, 2021, 104, 15, 199-207.

Aiba S., Kimura Y. In vitro test methods to evaluate the effects of chemicals on innate and adaptive immune responses. *Current Opinion in Toxicology*, 2017, 5, 6-12.

Amiri S., Yousefi-Ahmadipour A., Hosseini M.J., Haj-Mirzaian A., Momeny M., Hosseini-Chegeni H., Mokhtari T., Kharrazi S., Hassanzadeh G., Amini S.M., Jafarinejad S., Ghazi-Khansari M. Maternal exposure to silver nanoparticles are associated with behavioral abnormalities in adulthood: Role of mitochondria and innate immunity in developmental toxicity. *Neurotoxicology*, 2018, 66: 66-77.

Aschberger K., Asturiol D., Lamon L., Richarz A., Gerloff K. Worth A. Grouping of multi-walled carbon nanotubes to read-across genotoxicity: A case study to evaluate the applicability of regulatory guidance. *Computational Toxicology*, 2019, 9, 22-35.

Aureli F., Ciprotti M., D'Amato M., do Nascimento da Silva E., Nisi S., Passeri D., Sorbo A., Raggi A., Rossi M., Cubadda F. Determination of Total Silicon and SiO₂ Particles Using an ICP-MS Based Analytical Platform for Toxicokinetic Studies of Synthetic Amorphous Silica. *Nanomaterials*, 2020, 10, 888.

Avramescu M.-L., Rasmussen P.E., Chénier M., Gardner H.D. Influence of pH, particle size and crystal form on dissolution behaviour of engineered nanomaterials. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 2017, 24(2):1553-1564.

Balasubramanyam A., Sailaja N., Mahboob M., Rahman M.F., Hussain S.M., Grover P. In vitro mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the Salmonella/microsome assay. *Toxicol. In Vitro*, 2010, 6, 1871-1876.

Bencsik A., Lestaevél P., Guseva Canu I. Nano- and neurotoxicology: An emerging discipline. *Progress in Neurobiology*, 2018, 160, 45-63.

Bencsik A., Lestaevél P. The challenges of 21st century neurotoxicology: the case of neurotoxicology applied to nanomaterials. *Frontiers Tox.*, 2021, 3: 629256.

Bettini S., Boutet-Robinet E., Cartier C., Coméra C., Gaultier E., Dupuy J., Naud N., Taché S., Gysan P., Reguer S., Thieriet N., Réfrégiers M., Thiaudière D., Cravedi J.-P., Carrière M., Audinot J.-N., Pierre F.H., Guzylack-Piriou L., Houdeau E. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Scientific Reports*, 2017, 7, 40373.

Bhattacharya K., Kiliç G., Costa P.M., Fadeel B. Cytotoxicity screening and cytokine profiling of nineteen nanomaterials enables hazard ranking and grouping based on inflammogenic potential. *Nanotoxicology*, 2017, 11:6, 809-826.

Bird R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with colonic carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett*, 1987, 37: 147-151.

Bolon B., Bradley A., Butt M., Jensen K., Krinke G., Mellon R.D. Compilation of international regulatory guidance documents for neuropathology assessment during nonclinical general toxicity and specialized neurotoxicity studies. *Toxicol. Pathol.*, 2011, 39, 92-96.

Bolon B., Garman R.H., Pardo I.D., Jensen K., Sills R.C., Roulois A., Radovsky A., Bradley A., Andrews-Jones L., Butt M., Gumprecht L. STP position paper : Recommended practices for sampling and processing the nervous system (brain, spinal cord, nerve, and eye) during nonclinical general toxicity studies. *Toxicol. Pathol.*, 2013, 41(7): 1028-48.

Bouwmeester H., van der Zande M., Jepson M.A. Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2018, 10 : e1481.

Brand W., Ruud J., Peters B., Braakhuis H.M., Maślankiewicz L., Oomen A.G. Possible effects of titanium dioxide particles on human liver, intestinal tissue, spleen and kidney after oral exposure. *Nanotoxicology*, 2020, 14, 7, 985-1007.

Braniste V., Leveque M., Buisson-Brenac C., Bueno L., Fioramonti J., Houdeau E. Oestradiol decreases colonic permeability through and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *J Physiol*, 2009, 587, 13, 3317-3328.

Brun E., Barreau F., Veronesi G., Fayard B., Sorieul S., Chanéac C., Carapito C., Rabilloud T., Mabondzo A., Herlin-Boime N., Carrière M. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Particle and Fibre Toxicology*, 2014, 11, 13.

Caderni G., Femia A.P., Giannini A., Favuzza A., Luceri C., Salvadori M., Dolara P. Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Res.*, 2003, 63, 2388-2392.

Canova S., Fiorasi F., Mognato M., Grifalconi M., Reddi E., Russo A., Celotti L. Modeled Microgravity Affects Cell Response to Ionizing Radiation and Increases Genomic Damage. *Radiat. Res.*, 2005, 163, 191-199.

Charles S., Jomini S., Fessard V., Bigorgne-Vizade E., Rousselle C., Michel C. Assessment of the in vitro genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in a regulatory context. *Nanotoxicology*, 2018, 12, 357-374.

Chen J., Wang H., Long W., Shen X., Wu D., Song S.S., Sun Y.M., Liu P.X., Fan S.J., Fan F.Y., Zhang X.D. Sex differences in the toxicity of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in mice. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8, 2409-2419.

Colacci A., Vaccari M., Mascolo M., Perdichizzi S., Zanzi C., Parfett C., Corvi R., Grilli S. The use of SHE cell transformation assay to predict the transforming potential of non-genotoxic carcinogens. In: *ALTEX Proceedings, 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Science*, 2014, vol. 3, p. 141.

Combes R., Grindon C., Cronin M.T. D., Roberts D.W., Garrod J. Proposed integrated decision-tree testing strategies for mutagenicity and carcinogenicity in relation to the EU REACH legislation. *Altern Lab Anim*, 2007, 35, 267-87.

Coméra C., Cartier C., Gaultier E., Catrice O., Panouille Q., El Hamdi S., Tirez K., Nelissen I., Théodorou V., Houdeau E. Jejunal villus absorption and paracellular tight junction permeability are major routes for early intestinal uptake of food-grade TiO₂ particles: an in vivo and ex vivo study in mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 2020, 17, 26.

Corvi R., Madia F., Guyton K.Z., Kasper P., Rudel R., Colacci A., Kleinjans J., Jennings P. Moving forward in carcinogenicity assessment: Report of an EURL ECVAM/ESTIV workshop. *Toxicol In Vitro*. 2017, 45(Pt 3): 278-286.

Corvi R., Vanparys, P. International prevalidation study on cell transformation assay. Preface. *Mutat Res*, 2012, 744, 1-2.

Cui Y.H., Chen X.Y., Zhou Z., Lei Y., Ma M.N., Cao R.J., Wen C., Che Y. Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats. *Chemosphere*, 2014, 96, 99-104.

DeLoid G.M., Cohen J.M., Pyrgiotakis G., Demokritou P. Preparation, characterization, and in vitro dosimetry of dispersed, engineered nanomaterials. *Nat Protoc.*, 2017; 12(2): 355-371.

des Rieux A. , Ragnarsson E.G.E., Gullberg E., Prémat V., Schneider Y.-J., Artursson P. Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *Eur J Pharm Sci.*, 2005, 25(4-5): 455-65.

Doak S.H. Manshian B., Jenkins G.J.S., N. Singh. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutat. Res.* 2012, 745, 104-111.

Doak S.H., Griffiths S.M., Manshian B., Singh N., Williams P.M., Brown A.P., Jenkins G.J.S. Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis*, 2009, 24(4): 285-93.

Donaldson K., Poland C.A., Schins R.P.F. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology*, 2010; 4: 414-20.

EFSA guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. *EFSA Journal*, 2018, 16(7): 5327.

EFSA opinion on genotoxicity testing strategies. *EFSA Journal*, 2011, 9(9): 2379.

ENV/JM/TG/RD, 2014. 17 Report on the evaluation of genotoxic or non-genotoxic activity of the organic chemicals tested in the she cell transformation assay. In: 26th Meeting of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Programme (WNT).

Escartin *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 2021, 24, 312-325.

Fantino M., E. Gourmet. Apports nutritionnels en France en 2005 chez les enfants non allaités âgés de moins de 36 mois. *Arch. Pediatr.* 2008, 15 (4): 446-55.

Femia A.P., Bendinelli B., Giannini A., Salvadori M., Pinzani P., Dolara P., Caderni G. Mucin-depleted foci have betacatenin gene mutations, altered expression of its protein, and are dose- and time-dependent in the colon of 1,2-dimethylhydrazine- treated rats. *Int J Cancer.*, 2005, 116: 9-15.

Femia A.P., Giannini A., Fazi M., Tarquini E., Salvadori M., Roncucci L., Tonelli F., Dolara P., Caderni G. Identification of mucin depleted foci in the human colon. *Cancer Prev Res (Phila).*, 2008, 1: 562-567.

Fine J.H., Bondy G.S., Coady L., Pearce B., Ross N., Tayabali A.F., Halappanavar S., Caldwell D., Curran I., Lefebvre D.E. Immunomodulation by gastrointestinal carbon black nanoparticle exposure in ovalbumin T cell receptor transgenic mice. *Nanotoxicology*, 2016, 10:10, 1422-1430.

Fowler P., Smith K., Young J., Jeffrey L., Kirkland D., Pfuhler S., Carmichael P. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutat Res.*, 2012, 742(1-2), 11-25.

Geraets L., Oomen A.G., Krystek P., Jacobsen N.R., Wallin H., Laurentie M., Verharen H.W., Brandon E.F.A., de Jong W.H. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol*, 2014, 11, 30.

Gerloff K., Landesmann B., Worth A., Munn S., Palosaari T., Whelan M. The Adverse Outcome Pathway approach in nanotoxicology. *Computational Toxicology* 1 (2017) 3-11.

Ghomrasni N.B., Chivas-Joly C., Devoille L., Hochepped J.-F., Feltin N. Challenges in sample preparation for measuring nanoparticles size by scanning electron microscopy from suspensions, powder form and complex media. *Powder Technology*, 2020, 359, 226-237.

Gonzalez L., Sanderson B.J.S., Kirsch-Volders M. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis*, 2011, 26, 1, 185-191.

Grundmann D., Klotz M., Rabe H., Glanemann M., Schäfer K.H. Isolation of high-purity myenteric plexus from adult human and mouse gastrointestinal tract. *Sci Rep.*, 2015, 5: 9226.

Guadagnini R., Kenzaoui B.H., Walker L., Pojana G., Magdolenova Z., Bilanicova D., Saunders M., Juillerat-Jeanneret L., Marcomini A., Huk A., Dusinska M., Fjellsbø L.M., Marano F., Boland S. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology*, 2015, 9(S1): 13-24.

Guillard A., Gaultier E., Cartier C., Devoille L., Noireaux J., Chevalier L., Morin M., Grandin F., Lacroix M.Z., Coméra C., Cazanave A., de Place A., Gayraud V., Bach V., Chardon K., Bekhti N., Adel-Patient K., Vayssière C., Fiscaro P., Feltin N., de la Farge F., Picard-Hagen N., Lamas B., E. Houdeau. Basal Ti level in the human placenta and meconium and evidence of a materno-foetal transfer of food-grade TiO₂ nanoparticles in an ex vivo placental perfusion model. *Particle and Fibre Toxicology*, 2020, 17, 51.

Halappanavar S., Ede J. D., Shatkin J. A., Krug H. F. (2019). "A systematic process for identifying key events for advancing the development of nanomaterial relevant adverse outcome pathways." *NanoImpact* 15: 100178.

Han H.Y., Cho J.W., Seong E., Park E.J., Lee G.H., Kim D.W., Yang Y.S., Oh J.H., Yoon S., Lee T.G., Kim T.W., Park E.J. Amorphous silica nanoparticle-induced pulmonary inflammatory response depends on particle size and is sex-specific in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 2020, 1; 390: 114890.

Hartmann N.B., Jensen K.A., Baun A., Rasmussen K., Rauscher H., Tantra R., Cupi D., Gilliland D., Pianella F., Riego S., Juan M. Techniques and Protocols for Dispersing Nanoparticle Powders in Aqueous Media—is there a Rationale for Harmonization ? *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2015, 00:1-28.

Hata K., Yamada Y., Kuno T., Hirose Y., Hara A., Qiang S.H., Mori H. Tumor formation is correlated with expression of β -catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Sci.*, 2004, 95, 4, 319.

Heringa M.B., Peters R.J.B., Bleys R.L.A.W., van der Lee M.K., Tromp P.C., van Kesteren P.C.E., van Eijkeren J.C.H., Undas A.K., Oomen A.G., Bouwmeester H. Detection of titanium

particles in human liver and spleen and possible health implications. *Particle and Fibre Toxicology*, 2018, 15:15.

Hirose Y., Kuno T., Yamada Y., Sakata K., Katayama M., Yoshida K., Qiao Z., Hata K., Yoshimi N., Mori H. Azoxymethane-induced beta-catenin-accumulated crypts in colonic mucosa of rodents as an intermediate biomarker for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2003, 24, 107-111.

Jacobs M.N., Colacci A., Corvi R., Vaccari M., Aguila M.C., Corvaro M., Delrue N., Desaulniers D., Ertych N., Jacobs A., Luijten M., Madia F., Nishikawa A., Ogawa K., Ohmori K., Paparella M., Sharma A.K., Vasseur P. Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. *Archives of Toxicology*, 2020, 94, 2899-2923.

Jalili P., Gueniche N., Lancelleur R., Burel A., Lavault M.T., Sieg H., Estrela-Lopis I. Investigation of the in vitro genotoxicity of two rutile TiO₂ nanomaterials in human intestinal and hepatic cells and evaluation of their interference with toxicity assays. *NanoImpact*, 2018, 11: 69-81.

Janer G., Mas del Molino E., Fernández-Rosas E., Fernández A., Vázquez-Campos S. Cell uptake and oral absorption of titanium dioxide nanoparticles, *Toxicology Letters*, 2014, 228, 2, 103-110.

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

Kaur I., Ellis L.-J., Romer I., Tantra R., Carriere M., Allard S., Mayne-L'Hermitte M., Minelli C., Unger W., Potthoff A., Rades S., Valsami-Jones E. Dispersion of Nanomaterials in Aqueous Media: Towards Protocol Optimization. *J. Vis. Exp.*, 2017, 130, e56074.

Kermanizadeh A., Balharry D., Wallin H., Loft S., Møller P. Nanomaterial translocation-the biokinetics, tissue accumulation, toxicity and fate of materials in secondary organs-a review. *Crit Rev Toxicol.*, 2015, 45(10): 837-72.

Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y., Kim Y.K., Lee Y.S., Jeong D.H., Cho M.H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2007, 3, 95-101.

Kim J.S., Sung J.H., Ji J.H., Song K.S., Lee J.H., Kang C.S., Yu I.J. In vivo genotoxicity of silver nanoparticles after 90-day silver nanoparticle inhalation exposure. *Saf Health Work*, 2011, 2, 34-38.

Kim M.Y. Intracellular and extracellular factors influencing the genotoxicity of nitric oxide and reactive oxygen species. *Oncol Lett.*, 2017, 13(3): 1417-1424.

Kraft A.D., Harry G.J. Features of Microglia and Neuroinflammation Relevant to Environmental Exposure and Neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health*, 2011, 8(7): 2980-3018.

Krause B.C., Kriegel F.L., Rosenkranz D., Dreijack N., Tentschert J., Jungnickel H., Jalili P., Fessard V., Laux P., Luch A. Aluminum and aluminum oxide nanomaterials uptake after oral exposure - a comparative study. *Sci Rep*, 2020, 10, 2698.

Kreyling W.G., Holzwarth U., Schleh C., Kozempel J., Wenk A., Haberl N., Hirn S., Schäffler M., Lipka J., Semmler-Behnke M., Gibson N. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2, *Nanotoxicology*, 2017, 11, 443-453.

Lamas B., Martins Breyner N., Houdeau E. Impacts of foodborne inorganic nanoparticles on the gut microbiota-immune axis: potential consequences for host health. *Particle and Fibre Toxicology*, 2020, 17, 19.

- Lammel T., Mackevica A., Johansson B.R., Sturve J. Endocytosis, intracellular fate, accumulation, and agglomeration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in the rainbow trout liver cell line RTL-W1. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26, 15354-15372.
- Lamon L., Aschberger K., Asturiol D., Richarz A., Worth A. Grouping of nanomaterials to read-across hazard endpoints: a review. *Nanotoxicology*. 2019, 13(1): 100-118.
- Lehner R., Wohlleben W., Septiadi D., Landsiedel R., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B. A novel 3D intestine barrier model to study the immune response upon exposure to microplastics. *Arch Toxicol*. 2020, 94(7): 2463-2479.
- Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Lam H.R., Larsen E.H. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol*, 2011, 8: 18.
- Luo K., Park H., Adra H.J., Ryu J., Lee J.-H., Yu J., Choi S.-J., Kim Y.-R. Charge-switchable magnetic separation and characterization of food additive titanium dioxide nanoparticles from commercial food. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 393, 122483.
- Magdolenova Z., Bilaničová D., Pojana G., Fjellsbø L.M., Hudecova A., Hasplova K., Marcomini A., Dusinska M. Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related in vitro cytotoxicity and genotoxicity. *J Environ Monit.*, 2012, 14(2): 455-64.
- Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V., Dusinska M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2014, 8(3): 233-78.
- Maglietta R., Liuzzi V.C., Cattaneo E., Laczko E., Piepoli A., Panza A., Carella M., Palumbo O., Staiano T., Buffoli F., Andriulli A., Marra G., Ancona N. Molecular pathways undergoing dramatic transcriptomic changes during tumor development in the human colon. *BMC Cancer.*, 2012, 19, 12: 608.
- Ma-Hock L., Sauer U.G., Ruggiero E., Keller J.-G., Wohlleben W., Landsiedel R. The Use of Nanomaterial In Vivo Organ Burden Data for In Vitro Dose Setting. *Small*, 2021, 17, 15, 202005725.
- Marucco A., Prono M., Beal D., Alasonati E., Fiscaro P., Bergamaschi E., Carrière M., Fenoglio I. Biotransformation of Food-Grade and Nanometric TiO₂ in the Oral-Gastro-Intestinal Tract: Driving Forces and Effect on the Toxicity toward Intestinal Epithelial Cells. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 27, 10(11): 2132.
- Mascolo M.G., Perdichizzi S., Rotondo F., Morandi E., Guerrini A., Silingardi P., Vaccari M., Grilli S., Colacci A. Balb/c 3t3 cell transformation assay for the prediction of carcinogenic potential of chemicals and environmental mixtures. *Toxicology in vitro*, 2010, 24, 1292-1300.
- Mascolo M.G., Perdichizzi S., Vaccari M., Rotondo F., Zanzi C., Grilli S., Paparella M., Jacobs M.N., Colacci A. The transformics assay: First steps for the development of an integrated approach to investigate the malignant cell transformation in vitro. *Carcinogenesis*, 2018, 39, 955-967.
- Maurin N., Fogue-Lafitte M.-E., Levy P., Zimmer A., Bara J. Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenesis. *Int. J. Cancer.*, 2006, 120, 477-483.
- Mohammadpour R., Yazdimamaghani M., Cheney D.L., Jedrzkiewicz J., Ghandehari H. Subchronic toxicity of silica nanoparticles as a function of size and porosity. *Journal of Controlled Release*, 2019, 304, 216-232.

- Mori H., Yamada Y., Kuno T., Hirose Y. Aberrant crypt foci and -catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. *Mutation Research*, 2004, 566, 191-208.
- Nelson B.C., Wright C.W., Ibuki Y., Moreno-Villanueva M., Karlsson H.L., Hendriks G., Sims C. M., Singh N., Doak S.H. Emerging metrology for high-throughput nanomaterial genotoxicology. *Mutagenesis*, 2017, 32, 1, 215-232.
- Nikolaev M., Mitrofanova O., Broguiere N., Geraldo S., Dutta D., Tabata Y., Elci B., Brandenberg N., Kolotuev I., Gjorevski N., Clevers H., Lutolf M.P. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature*, 2020, 585, 574-578.
- OECD 2014. Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials: Report of the OECD Expert Meeting. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 43. ENV/JM/MONO(2014)34.
- Ojeda D., Taboada-López M.V., Bolea E., Pérez-Arantegui J., Bermejo-Barrera P., Moreda-Piñeiro A., Laborda F. Size characterization and quantification of titanium dioxide nano- and microparticles-based products by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled to Dynamic Light Scattering and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1122, 20-30.
- Oomen A.G., Bleeker E.A., Bos P.M., van Broekhuizen F., Gottardo S., Groenewold M., Hristozov D., Hund-Rinke K., Irfan M.A., Marcomini A., Peijnenburg W.J., Rasmussen K., Jiménez A.S., Scott-Fordsmand J.J., van Tongeren M., Wiench K., Wohlleben W., Landsiedel R. Grouping and Read-Across Approaches for Risk Assessment of Nanomaterials. *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 26, 12(10): 13415-34.
- Peterson R.J., Montoro Bustos A.R., Toman B., Johnson M.E., Ellefson M., Caceres G.C., Neuer A.L., Chan Q., Kemling J.W., Mader B., Murphy K., Roesslein M. Determining what really counts: modeling and measuring nanoparticle number concentrations. *Environ. Sci.*, 2019, 6, 2876-2896.
- Peterson R.T., Nass R., Boyd W.A., Freedman J.H., Dong K., Narahashi T. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology*, 2008, 29, 546-555.
- Pfuhler S., Elespuru R., Aardema M.J., Doak S.H., Donner E.M., Honma M., Kirsch-Volders M., Landsiedel R., Manjanatha M., Singer T., Kim J.H. Genotoxicity of nanomaterials: Refining strategies and tests for hazard identification. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2013, 4, 229-239.
- Pisani C., Rascol E., Dorandeu C., Gaillard J.-C., Charnay C., Guari Y., Chopineau J., Armengaud J., Devoisselle J.M., Prat O. The species origin of the serum in the culture medium influences the in vitro toxicity of silica nanoparticles to HepG2 cells. *PLoS One.*, 2017, 12(8): e0182906.
- Rohrbeck A., Salinas G., Maaser K., Linge J., Salovaara S., Corvi R., Borlak J. Toxicogenomics applied to in vitro carcinogenicity testing with Balb/c 3T3 cells revealed a gene signature predictive of chemical carcinogens. *Toxicol Sci*, 2010, 118, 31-41.
- Roncucci L., Stamp D., Medline A., Cullen J.B., Bruce W.R. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol*, 1991, 22:287-94.
- Rovida C., Hartung T. Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals - a report by the transatlantic think tank for toxicology (t(4)), ALTEX, 2009, 26, 187-208.
- Sager T.M., Porter D.W., Robinson V.A., Lindsley W.G., Schwegler-Berry D.E., Castranova V. Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicology*, 2007; 1(2): 118129.

- Sasaki K., Mizusawa H., Ishidate M. Isolation and characterization of ras-transfected balb/3t3 clone showing morphological transformation by 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Jpn J Cancer Res*, 1988, 79, 921-930.
- Sasaki K., Umeda M., Sakai A., Yamazaki S., Tanaka N. Transformation assay in bhas 42 cells: A model using initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenic potential of chemicals. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.*, 2015, 33, 1-35.
- Sato T., Vries R.G., Snippert H.J., van de Wetering M., Barker N., Stange D.E., van Es J.H., Abo A., Kujala P., Peters P.J., Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-5.
- Shi H., Magaye R., Castranova V., Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.*, 2013, 10, 15.
- Singh S. Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Toxicol Mech Methods*, 2019, 29(4): 300-311.
- Slikker Jr W., Acuff K., Boyes W.K., Chelonis J., Crofton K.M., Dearlove G.E., Li A., Moser V.C., Newland C., Rossi J., Schantz S., Sette W., Sheets L., Stanton M., Tyl S., Sobotka T.J. Behavioral test methods workshop, *Neurotoxicol Teratol*, 2005, 27, 417-427.
- Slowing I., Trewyn B.G., Lin V.S.-Y. Effect of Surface Functionalization of MCM-41-Type Mesoporous Silica Nanoparticles on the Endocytosis by Human Cancer Cells. *J. AM. CHEM. SOC.*, 2006, 128, 14792-14793.
- Summers H.D., Brown M.R., Holton M.D, Tonkin J.A., Hondow N., Brown A.P., Brydson R., Rees P. Quantification of Nanoparticle Dose and Vesicular Inheritance in Proliferating Cells. *ACS Nano.*, 2013, 7(7): 6129-6137.
- Suzui M., Moriok T., Yoshimi N. Colon Preneoplastic Lesions in Animal Models. *J Toxicol Pathol.*, 2013, 26: 335-341.
- Taboada-López M.V., Herbello-Hermelo P., Domínguez-González R., Bermejo-Barrera P., Moreda-Piñeiro A. Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS. *Talanta*, 2019, 195, 23-32.
- Takayama T., Katsuki S., Takahashi Y., Ohi M., Nojiri S., Sakamaki S., Kato J., Kogawa K., Miyake H., Niitsu Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med.*, 1998, 339(18): 1277-84.
- Tassinari R., Di Felice G., Butteroni C., Barletta B., Corinti S., Cubadda F., Aureli F., Raggi A., Narciso L., Tait S., Valeri M., Martinelli A., Di Virgilio A., Pacchierotti F., Cordelli E., Eleuteri P., Villani P., Fessard V., Maranghi F. Hazard identification of pyrogenic synthetic amorphous silica (NM-203) after sub-chronic oral exposure in rat: A multitarget approach, *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 137, 111168.
- Thomas D.G., Smith J.N., Thrall B.D., Baer D.R., Jolley H., Munusamy P., Kodali V., Demokritou P., Cohen J., Teeguarden J.G. ISD3: a particokinetic model for predicting the combined effects of particle sedimentation, diffusion and dissolution on cellular dosimetry for in vitro systems. *Particle and Fibre Toxicology*, 2018, 15, 6.
- Toda T., Yoshino S. Amorphous nanosilica particles block induction of oral tolerance in mice, *Journal of Immunotoxicology*, 2016, 13, 5, 723-728.
- Utembe W., Clewell H., Sanabria N., Doganis P., Gulumian M. Current Approaches and Techniques in Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modelling of Nanomaterials. *Nanomaterials*, 2020, 10, 1267.

- Vaccari M., Argnani A., Horn W., Silingardi P., Giungi M., Mascolo M.G., Bartoli S., Grilli S., Colacci A. Effects of the protease inhibitor antipain on cell malignant transformation. *Anticancer Research*, 1999, 19, 589-596.
- Valdiglesias V., Kilic G., Costa C., Fernandez-Bertolez N., Pasaro E., Teixeira J.P., Laffon B. Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environ Mol Mutagen*, 2015, 56(2), 125-148.
- van Thriel C. Neurotoxicology: an update on epidemiology, mechanisms, and pathology. *Acta Neuropathologica*, 2019, 138(3), 339-341.
- Vanparys P., Corvi R., Aardema M.J., Gribaldo L., Hayashi M., Hoffmann S., Schechtman L. Application of in vitro cell transformation assays in regulatory toxicology for pharmaceuticals, chemicals, food products and cosmetics. *Mutat Res*, 2012, 744, 111-116.
- Vasseur P., Lasne C. OECD detailed review paper (DRP) number 31 on "cell transformation assays for detection of chemical carcinogens": Main results and conclusions. *Mutat Res*, 2012, 744, 8-11.
- Vorhees C.V., Williams M.T., Hawkey A.B., Levin E.D. Translating Neurobehavioral Toxicity Across Species From Zebrafish to Rats to Humans: Implications for Risk Assessment. *Frontiers in Toxicology*, 2021, 3(3).
- Wang J.J., Sanderson B.J., Wang H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res.*, 2007, 2, 628(2): 99-106.
- Wigger H., Nowack B. Material-specific properties applied to an environmental risk assessment of engineered nanomaterials - implications on grouping and read-across concepts. *Nanotoxicology*, 2019, 13(5): 623-643.
- Xu Y., Tang H., Wang H., Liu Y. Blockade of oral tolerance to ovalbumin in mice by silver nanoparticles, *Nanomedicine (Lond)*, 2015, 10(3): 419-31.
- Yamada Y., Yoshimi N., Hirose Y., Kawabata K., Matsunaga K., Shimizu M., Hara A., Mori H. Frequent β -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis, *Cancer Res.*, 2000, 60, 3323-3327.
- Yamada Y., Yoshimi N., Hirose Y., Matsunaga K., Katayama M., Sakata K., Shimizu M., Kuno T., Mori H. Sequential analysis of morphological and biological properties of β -catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, 2001, 61, 1874-1878.
- Yameen B., Choi W.I., Vilos C., Swami A., Shi J., Farokhzad O.C. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *Journal of Controlled Release*, 2014, 190, 28, 485-499.
- Yoshimi N., Morioka T., Kinjo T., Inamine M., Kaneshiro T., Shimizu T., Suzui M., Yamada Y., Mori H. Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with Alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Cancer Sci.*, 2004, 95: 792-797.
- Zheng Y., Kramer P., Lubet R., Steele V., Kelloff G., Pereira M. Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*, 1999, 20, 255-260.

ANNEXE 1

Présentation des intervenants

PREAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL NANO ET ALIMENTATION

Président

M. Fabrice NESSLANY – Chef du service de toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille – toxicologie, génotoxicité et évaluation des risques.

Vice-président

M. Emmanuel FLAHAUT – Directeur de recherche au centre national de la recherche scientifique (CNRS) – physico-chimie, écotoxicologie.

Membres

Mme Anna BENCSIK – Directrice de Recherche à l'Anses – neurotoxicologie – nanotoxicologie *in vivo* – histopathologie.

Mme Marie CARRIERE – Chercheure au Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives – nanotoxicologie, biologie cellulaire, physico-chimie.

M. Patrick CHASKIEL – Enseignant chercheur à l'université Paul-Sabatier Toulouse III – économie, sciences de la communication. M CHASKIEL a participé au GT de juin 2017 à juin 2019.

M. Laurent DEVOILLE – Ingénieur de recherche au Laboratoire national de métrologie – physique, métrologie.

M. Fernand DORIDOT – Enseignant chercheur à l'Institut catholique des Arts et Métiers de Lille – histoire et philosophie des sciences et techniques, gouvernance des technologies.

Mme Valérie FESSARD – Chef d'unité toxicologie des contaminants alimentaires à l'Anses – toxicologie *in vivo*.

M. Eric HOUDEAU – Directeur de recherche à l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) – physiologie, toxicologie alimentaire.

M. Olivier JOUBERT – Enseignant chercheur à l'université de Lorraine – biologie moléculaire, biotechnologies, toxicologie.

Mme Stéphanie LACOUR – Directrice de recherche au CNRS – droit, réglementation et régulation des nouvelles technologies. Mme LACOUR a participé au GT de juin 2017 à juin 2019.

M. Stéphane PEYRON – Maître de conférences à l'université de Montpellier – physico-chimie, matériaux au contact des denrées alimentaires.

Mme Odette PRAT – Retraitée – Ex-chargée de recherche au Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives – toxicogénomique.

Mme Marie-Hélène ROPERS – Chargée de recherche à l'INRA – physico chimie, nanomatériaux dans l'alimentation.

COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

CES Evaluation des risques chimiques liés aux aliments

Président

M. Bruno LE BIZEC – ONIRIS, Professeur des universités. Chimie analytique et évaluation du risque.

Vice-présidents

M. Fabrice NESSLANY – Chef du service de toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille. Toxicologie, génotoxicité et évaluation des risques.

Mme Karine TACK – IRSN, Responsable de laboratoire. Chimie analytique.

Membres

M. Claude ATGIE – Bordeaux-INP, Professeur des universités. Toxicologie.

M. Pierre-Marie BADOT – Université Bourgogne Franche-Comté, Professeur des universités. Transfert des contaminants.

Mme Martine CLAUW – École nationale vétérinaire de Toulouse, Professeur des universités. Toxicologie.

Mme Marie-Yasmine DECHRAOUI – Chercheur en toxicologie environnementale. Biotoxines et toxicologie environnementale.

M. Nicolas DELCOURT – Université de Toulouse, Maître de conférences et pharmacien hospitalier. Toxicologie clinique, biochimie et neurosciences.

Mme Christine DEMEILLIERS – Université Grenoble-Alpes, Maître de conférences. Toxicologie, nutrition.

M. Erwan ENGEL – INRA, Directeur de recherches. Chimie analytique.

M. Jérôme GAY-QUEHEILLARD – Université Picardie - Jules Verne, Maître de conférences. Impacts digestifs et métabolisme.

M. Petru JITARU – Anses, laboratoire de sécurité des aliments, Chef d'unité. Chimie analytique.

Mme Sonia KHIER – Université de Montpellier, Maître de conférences. Pharmacocinétique.

Mme Emilie LANCE – Université de Reims, Maître de conférences - compétences en biotoxines et écotoxicologie.

Mme Caroline LANIER – Université de Lille, Maître de conférences - compétences en évaluation des risques sanitaires et gestion des risques alimentaires.

Mme Raphaële LE GARREC – Université de Bretagne Occidentale, Maître de conférences - compétences en toxicologie, biotoxines et réglementation.

M. Ludovic LE HEGARAT – Anses, laboratoire de Fougère, chef d'unité adjoint. Toxicologie prédictive et génotoxicologie.

M. Nicolas LOISEAU – INRA, Chargé de recherche. Biochimie métabolique, chimie et biophysique moléculaire.

M. David MAKOWSKI – INRA, Directeur de recherche. Agronomie, statistiques et modélisation.

M. Eric MARCHIONI – Université de Strasbourg, Professeur des universités. Chimie analytique.

M. Jean-François MASFARAUD – Université de Lorraine, Maître de conférences. Écotoxicologie et évaluation des risques sanitaires.

M. César MATTEI – Université d'Angers, Maître de conférences. Toxicologie.

M. Alain-Claude ROUDOT – Université de Bretagne Occidentale, Professeur des universités. Modélisation mathématique et expologie.

M. Yann SIVRY – Université Paris Diderot/IPGP, Maître de conférences. Pollution environnementale et nanoparticules.

Mme Paule VASSEUR – Professeur des universités émérite- compétences en toxicologie.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. Bruno TESTE – Chargé de projets scientifiques – Unité d'évaluation des risques liés aux aliments (UERALIM) – Anses.

Contribution scientifique

Mme Eleni ANASTASI – EU-FORA fellow (State General Laboratory of Cyprus / Anses).

M. Moez SANAA – Chef d'unité – Unité d'évaluation des risques liés aux aliments (UERALIM) – Anses.

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Anses.