



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 29 octobre 2015

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

relatif à une « demande d'avis sur la réalisation d'un essai impliquant l'utilisation du dioxyde de titane (forme anatase) comme traceur de digestibilité dans un essai réalisé sur des poulets »

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 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 rendus publics.

L'Anses a été saisie, le 18 août 2015, par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis sur la réalisation d'essais impliquant l'utilisation du dioxyde de titane (forme anatase) comme traceur de digestibilité dans des essais réalisés sur poulets.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le dioxyde de titane (TiO₂) est utilisé comme additif en alimentation humaine (E171) entre autres comme colorant blanc dans l'enrobage (par ex. médicaments, dragées et chewing-gums). Il est

également utilisé comme additif sensoriel (colorant) dans l'alimentation des chiens et des chats (annexe 1 du règlement CE 1831/2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux¹). Cependant, l'utilisation de cet additif n'est pas autorisée dans l'alimentation des animaux producteurs de denrées alimentaires.

Ce produit est utilisé dans des expérimentations comme marqueur de la fraction solide (par ex. Wilfart *et al.* 2006) en raison de son indigestibilité. Le pétitionnaire a joint une liste de publications récentes relatant l'utilisation du TiO₂ comme marqueur indigestible dans des essais de digestibilité chez le poulet (Denstadli *et al.* 2010 ; O'Neill *et al.* 2012 ; Romero *et al.*, 2013 ; Woyengo *et al.* 2010). En raison de son absorption intestinale quasi nulle, le titane contenu dans la terre a également été utilisé comme marqueur dans des études estimant l'ingestion de sol par les animaux élevés en plein air (Healy 1968 ; Fries *et al.* 1982).

L'Unité de Recherche Avicole (URA) et le Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (PEAT) de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) développent des protocoles d'essais consacrés à l'étude de la physiologie des espèces aviaires et de leurs systèmes d'élevage. Dans ce contexte, des mesures de digestibilité des aliments destinés aux oiseaux doivent être réalisées. Pour cela un traceur indigestible est incorporé aux aliments pour animaux et le choix de l'INRA s'est porté sur le dioxyde de titane sous forme anatase² dont l'usage à cette fin est déjà documenté dans la littérature spécialisée.

Le demandeur souhaite pouvoir utiliser ce produit dans plusieurs expérimentations à une dose de 0,5% dans des aliments destinés aux volailles.

Le demandeur a estimé que la quantité de dioxyde de titane utilisée dans les cinq prochaines années serait de 150 kg à savoir 30 kg par an. L'INRA indique dans la lettre d'accompagnement que les fumiers de l'unité expérimentale PEAT sont mélangés à ceux de l'ensemble du site INRA de Nouzilly dont la surface d'épandage est de 380 ha dont 70 ha par an minimum sachant que cette surface tourne en fonction des cultures. La charge de titane par hectare est donc évaluée par le pétitionnaire à 0,39 kg (150 kg sur 380 ha) pour la période considérée de cinq ans.

Le pétitionnaire met à disposition un exemple de protocole réalisé en 2015 (2 pages), la fiche de données techniques, incluant les données de sécurité du fournisseur (Titanium (IV) oxide, anatase, Sigma Aldrich) et une liste de 6 publications mentionnant l'utilisation du TiO₂.

¹ http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/docs/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf, page 26/203, consulté le 26/10/2015

² Le dioxyde de titane se trouve à l'état naturel sous trois principales formes cristallines présentes dans les espèces minérale suivantes : rutil (CAS=1317-80-2, système cristallin quadratique), brookite (CAS = 1317-80-2, système cristallin orthorhombique) et anatase (CAS= 1317-70-0, système cristallin quadratique) (fiche toxicologique de INRS)

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « Alimentation animale » l'instruction de cette saisine. Ses travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise (Mai 2003) ».

Le comité d'experts spécialisé « Alimentation animale » a adopté les travaux d'expertise collective ainsi que ses conclusions et recommandations lors de sa séance du 13 octobre 2015 et vérifié télématiquement le 29 octobre 2015.

L'expertise s'est appuyée sur l'avis de l'Anses du 3 avril 2014 relatif aux lignes directrices pour les autorisations d'essais pour les produits non autorisés en alimentation animale et porte sur l'évaluation de l'innocuité pour l'animal, la sécurité pour l'utilisateur, le consommateur et l'environnement au regard des conditions de l'essai fournies par le pétitionnaire. L'expertise a consisté à évaluer le risque de l'introduction de 0,5% de TiO_2 dans l'aliment des poulets sur la santé des animaux, celle des consommateurs de ces poulets ainsi que le risque pour l'environnement suite à l'épandage des fientes contenant le TiO_2 .

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES ALAN

3.1. Risque pour la santé des poulets et du consommateur

Chez l'animal, l'utilisation du TiO_2 dans l'alimentation nécessite d'évaluer la fraction de ce marqueur qui peut être absorbée par la muqueuse intestinale pour valider cette substance comme marqueur de digestibilité. En cas d'absorption non nulle, son innocuité pour la santé animale et celle du consommateur des denrées animales doit aussi être évaluée. L'appréciation du risque éventuel pour le consommateur s'apprécie au vu des données de métabolisme du TiO_2 et de la présence des résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale. Dans le cadre de cette saisine, ne seront considérées que l'absorption et la possible distribution tissulaire du TiO_2 , le caractère "marqueur de digestibilité" ne relevant pas de l'analyse de risque.

Les propriétés biologiques des particules de TiO_2 dépendent de nombreux facteurs incluant notamment les caractéristiques physiques des particules et la dose d'apport de TiO_2 , mais aussi les conditions du milieu (pH, osmolarité). Ces principales caractéristiques sont la forme cristalline (anatase, rutil, brookite), la taille (microparticules ou nanoparticules), la forme et les propriétés de surface (hydrophobicité, charge électrique, etc.) des particules de TiO_2 (Fröhlich *et al.*, 2012). Une des propriétés essentielles modulant l'activité du TiO_2 est la taille des particules, selon leur nature micro (MP) ou nano (NP). D'après la recommandation de la Commission Européenne de 2011 relative à la définition des nanomatériaux ou nanoparticules, « on entend par "nanomatériau" un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous

forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ». Le TiO₂ utilisé comme marqueur de digestibilité comprend probablement une part majoritaire de MP, mais il ne peut être exclu qu'une fraction du produit soit sous forme de NP.

Jusqu'à un passé récent, il était supposé que des particules de taille supérieure à 50 nm présentaient une faible absorption par l'intestin des mammifères, mais il a été montré que les pores des cellules intestinales pouvaient laisser passer des particules de plus de 1000 nm (Al-Jubory *et al.*, 2013). Après ingestion de TiO₂ chez l'Homme, les particules dans l'intestin sont principalement sous forme d'anatase, avec des particules sphériques de 100 à 200 nm (Powell *et al.*, 2010) et l'absorption de telles particules a été démontrée par leur apparition dans le flux sanguin (Pele *et al.*, 2015). *In vitro* et *in vivo*, la pénétration de particules de TiO₂ dans l'intestin chez le rat ou la souris a été montrée pour des NP de taille comprise entre 12 nm (Brun *et al.*, 2014) et 66 nm (Nogueira *et al.*, 2012), et même pour des particules jusqu'à 300 nm (Bettini *et al.*, 2014).

L'absorption de NP a été considérée comme négligeable dans certaines études récentes (NP de 25 à 100 nm, Song *et al.*, 2015), même à forte dose d'apport (1 g/kg de PV/j chez le rat, NP de 20 nm, Cho *et al.*, 2013). Enfin dans une étude comparant des nanoparticules de TiO₂ (10 nm de type anatase et 70 nm de type rutile) à des particules plus grosses (1,8 µm de type rutile), Jones *et al.* (2015) n'ont pas observé de différence d'absorption intestinale entre les trois types de particules, ni *in vivo* chez l'homme (dose de 5 mg/kg de PV pendant 4 semaines), ni *in vitro* (monocouche d'entérocytes humains). Il ressort aussi de cette étude que les nanoparticules de TiO₂ sont susceptibles de s'agglomérer dans le liquide gastrique réduisant de ce fait la dose "nanoparticulaire" lors de l'exposition par voie orale. Ce dernier résultat corrobore ceux de Wang *et al.* (2012) qui avaient montré que les NP de TiO₂ pouvaient s'agréger au niveau intestinal en MP avec une taille d'environ 2000 nm dont le comportement physique dans l'intestin (déitement ultérieur en NP) est inconnu.

La fraction de TiO₂ absorbée par l'intestin peut induire une perturbation de l'homéostasie immunitaire dans le tissu lymphoïde intestinal (Bettini *et al.*, 2014), reflétée par un accroissement des CD4⁺³ dans l'intestin et une augmentation de certaines cytokines inflammatoires en fonction du segment intestinal considéré (Nogueira *et al.*, 2012). Néanmoins, au niveau intestinal, des effets positifs de NP de TiO₂ ont également été rapportés au travers de la surexpression de récepteurs intestinaux impliqués dans le transport des nutriments et de pompes à efflux inhibant l'entrée de certains toxiques (Dorier *et al.*, 2015). Au niveau systémique, des effets de doses de TiO₂ comprises entre 1 mg/kg/j et jusqu'à 1000 mg /kg/j sur des durées de 1 à 90 jours ont montré

³ Les lymphocytes T CD4⁺ appelés également lymphocytes T auxiliaires, sont un type différencié des autres lymphocytes T, non cytotoxiques, agissant comme des intermédiaires de la réponse immunitaire. Ils prolifèrent seulement lorsqu'ils sont liés à certains antigènes pathogènes, pour activer d'autres types de cellules qui agiront de manière plus directe sur la réponse, d'où leur autre nom de « cellules auxiliaires » des lymphocytes T.

des perturbations du fonctionnement de certains organes comme le foie, les reins, la rate (Jovanovic, 2015).

Les NP de TiO₂ ayant été absorbées peuvent être retrouvées dans différents tissus comme le foie, la rate, le rein (Jovanovic 2015). Néanmoins l'étude de Geraerts *et al.* (2014) montre un accroissement négligeable de TiO₂ dans la rate, le foie, le rein ou le cerveau chez des rats recevant jusqu'à 1024 mg de NP de TiO₂ sous forme d'anatase/rutile (80%/20%) pendant 91 jours. Par ailleurs, la teneur en Ti dans le muscle et la peau des rats était sous la limite de détection dans cette étude. Le potentiel de bioaccumulation du muscle est faible après exposition au Ti de diverses espèces comme la carpe (Sun *et al.*, 2007) et la truite (Ramsden *et al.*, 2009).

Conclusion pour la santé des poulets : Chez le poulet, aucune étude spécifique d'absorption de NP ou de MP de TiO₂ n'est disponible et l'éventuel effet sur la santé n'a pas été étudié. Néanmoins, il est possible de considérer que l'absorption de telles particules et l'effet sur la santé des poulets durant l'essai proposé soient négligeables dans la mesure où l'apport se fait sur des périodes courtes (5 jours) et dans des conditions différentes des études citées ci-dessus (administration par gavage).

Conclusion pour la santé du consommateur : La faible accumulation de Ti dans les denrées animales observée chez quelques espèces permet de considérer que le risque pour le consommateur est négligeable. Néanmoins, en l'absence de données chiffrées disponibles et au regard de la durée de demande d'autorisation, il serait préférable que les tissus présentant des risques de bioaccumulation de Ti (poumons, rate, foie, rein) soient retirés de la consommation.

3.2. Risque pour l'utilisateur

La fiche de donnée de sécurité du produit préconise d'utiliser des gants pour la manipulation du produit et des masques de protection de type N95 (US) ou de type P1 (EN 143). Etant donné qu'il ne peut être exclu qu'une fraction du produit soit sous forme de NP, des équipements de protection individuelle appropriés pourront être mis à disposition : des masques FFP3 peuvent être utilisés à condition que le masque soit bien ajusté sur le visage afin qu'il n'y ait pas de fuite sur les côtés du masque.

3.3. Risque pour l'environnement

Le pétitionnaire prévoit l'utilisation de 30 kg de dioxyde de titane (soit 18 kg de Ti) par an. Cette quantité sera rejetée dans les déjections. La surface d'épandage est de 70 ha annuels, soit 429 g de TiO₂ (257 g Ti) épandus annuellement par ha et un enrichissement des sols, sur la base de

3000 t de terre par ha, de 143 µg TiO₂/kg de terre (86 µg Ti/kg de terre). La concentration de Ti dans la couche superficielle des sols est variable, mais est en moyenne de 3 g/kg, principalement sous forme TiO₂ (Kabata-Pendias *et al*, 2001). La quantité épandue est donc négligeable par rapport à la concentration dans les sols. Ainsi les risques d'enrichissement significatif des sols sont très limités, même si ce type d'expérimentation est reconduit pendant 5 ans.

3.4. Conclusions

Compte tenu de la très faible absorption du dioxyde de titane et de son utilisation de très courte durée, un avis favorable peut être donné pour l'introduction des animaux dans la chaîne alimentaire. Néanmoins, en l'absence de données chiffrées disponibles et au regard de la durée de demande d'autorisation, les experts soulignent qu'il serait préférable que les tissus présentant des risques de bioaccumulation de Ti (poumons, rate, foie, rein) soient retirés de la consommation. Concernant le risque pour l'environnement, un épandage annuel de 30 kg de TiO₂ sur 70 ha pendant 5 ans n'entraîne pas d'enrichissement significatif de la couche superficielle du sol. Enfin, le risque pour l'animal a été considéré négligeable.

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 CES ALAN.

En l'absence de données chiffrées concernant la teneur en nanoparticules du produit, et dans la mesure où aucune précision supplémentaire n'a pu être obtenue concernant les données techniques du produit, l'Anses recommande que ses caractéristiques physico-chimiques soient précisées par le fournisseur et notamment la courbe de distribution en taille des particules.

Au-delà, l'Agence rappelle qu'elle engage prochainement un travail d'identification des nanomatériaux utilisés dans les filières alimentaires et d'évaluation des risques sanitaires qui pourraient y être associés.

Marc Mortureux

MOTS - CLES

Autorisation d'essai, poulet, dioxyde de titane, épandage.

BIBLIOGRAPHIE

Al-Jubory AR, Handy RD. (2013). Uptake of titanium from TiO₂ nanoparticle exposure in the isolated perfused intestine of rainbow trout: nystatin, vanadate and novel CO₂-sensitive components. *Nanotoxicology* **7**, 1282-1301.

Bettini S, Guzylack-Piriou L, Gaultier E, Cartier C, Comera C, Thiaudière D, Réfrégiers M, Carrière M, Boutet-Robinet E, Pierre F, Houdeau E. (2014). Distribution dans l'intestin et impacts sur le système immunitaire de nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) après exposition orale chez le rat. *Nutrition clinique et métabolisme* **28** : S29-S65.

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

Cho WS, Kang BC, Lee JK, Jeong J, Che JH, Seok SH. (2013). Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Part. Fibre Toxicol.* **10**: 9.

Denstadli V, Westereng B, Biniyam HG, Balance S, Knutsen SH, Svihus B. (2010). Effects of structure and xylanase treatment of brewer's spent grain on performance and nutrient availability in broiler chickens. *Br. Poultry Sci.* **51**, 419-426.

Dorier M, Brun E, Veronesi G, Barreau F, Pernet-Gallay K, Desvergne C, Rabilloud T, Carapito C, Herlin N, Carrière M. (2015). Impact of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles on uptake carriers and efflux pumps in Caco-2 gut epithelial cells. *Nanoscale*, **7**, 7352-7360.

Fries G, Marrow G, Snow P. (1982). Soil ingestion by Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* **65**, 611-618.

Fröhlich E, Pieber TR, Roblegg E. (2012). What is the Role of In-vitro Models in the Estimation of the Health Risk Caused by Nanoparticle Exposure?. In 'Risk Assessment and Management', Z. Zhang (Ed.), AcademyPublish.org, Cheyenne, Wyoming, USA.

Geraets L, Oomen AG, Krystek P, Jacobsen NR, Wallin H, Laurentie M, Verharen HW, Brandon E, de Jong WH. (2014). Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol*, **11**(1):30.

Healy W. (1968). Ingestion of Soil by Dairy Cows. *N.Z.J. Agric. Res.* **11**, 487.

Institut National de Recherche et de Sécurité-INRS (2013). Fiche toxicologique FT 291, édition 2013

Jovanovic B. (2015). Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive. *Integrated Environmental Assessment and Management*, **11**, 10-20.

Jones K, Morton J, ISmith I, Jurkschat K, Harding AH, Evans G. (2015). Human *in vivo* and *in vitro* studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **233**, 95-101.

Kabata-Pendias A, Pendias H. (2001). Trace elements in soils and plants. Third Edition, ISBN 0-8493-1575-1, 331 pp

Nogueira CM, de Azevedo WM, Dagli ML, Toma SH, Leite AZ, Lordello ML, Nishitokukado I, Ortiz-Agostinho CL, Duarte MI, Ferreira MA, Sipahi AM. (2012). Titanium dioxide induced inflammation in the small intestine. *World J Gastroenterol.* **18**, 4729-4735.

O'Neill HVM, Rademacher M, Muller-Harvey I, Stringano E, Knightley S, Wiseman J. (2012). Standardised ileal digestibility of crude protein and amino acids of UK grown peas and faba beans by broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* **175**, 158-167.

Pele LC, Thoree V, Bruggraber S, Koller D, Thompson RPH, Lomer MC, Powell JJ. (2015). Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers. *Particle and Fibre Toxicology.* 12:26.

Powell JJ, Faria N, Thomas-McKay E, Pele LC. (2010). Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J Autoimmun.* **34**, 226-233.

Ramsden CS, Smith TJ, Shaw BJ, Handy RD. (2009). Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology.* **18**, 939-951.

Recommandation n° 2011/696/UE de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). JOUE n° L275-38.

Romero LF, Parsons CM, Utterback PL, Plumstead PW, Ravindran V. (2013). Comparative effects of dietary carbohydrase without or with protease on the ileal digestibility of energy and amino acids and AME(n) in young broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* **181**, 35-44.

Song ZM, Chen N, Liu JH, Tang H, Deng X, Xi WS, Han K, Cao A, Liu Y, Wang H. (2015). Biological effect of food additive titanium dioxide nanoparticles on intestine: an in vitro study. *J. Appl. Toxicol.* **35**, 1169-1178.

Sun H, Zhang X, Niu Q, Chen Y, Crittenden JC. (2007). Enhanced Accumulation of Arsenate in Carp in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Water Air Soil Pollut.* **178**, 245-254

Wang Y, Chen Z, Ba T, Pu J., Chen T, Song Y, Gu Y, Qian Q, Xu Y, Xiang K, Wang H, Jia G. (2012). Susceptibility of Young and Adult Rats to the Oral Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles. Small DOI: 10.1002/smll.201201185.

Wilfart A, Montagne L, Noblet J, van Milgen J, Simmins H, Debicki-Garnier AM, Messenger B. (2006). La teneur en fibres alimentaires affecte la digestibilité des nutriments dans tous les segments du tube digestif chez le porc. *Journées Recherche Porcine.* **38**, 193-200.

Woyengo TA, Kiarie E, Nyachoti CM. (2010). Metabolizable energy and standardized ileal digestible amino acid contents of expeller-extracted canola meal fed to broiler chicks. *Poultry Sci.* **89**, 1182-1189.