

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 28 mai 2014

AVIS

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

**relatif à la demande d'autorisation d'emploi de l'isododécane pour la fabrication de
matériaux organiques entrant au contact d'eau destinée à la consommation humaine**

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'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été saisie le 5 février 2014 par la Direction générale de la santé (DGS) pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'autorisation d'emploi de l'isododécane pour la fabrication de matériaux organiques entrant au contact d'eau destinée à la consommation humaine (EDCH).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La mise sur le marché des matériaux et objets destinés à entrer en contact avec de l'EDCH d'une part, et leur utilisation dans les installations de production, de distribution et de conditionnement d'eau d'autre part, sont soumises aux dispositions réglementaires des articles R. 1321-48 et 49 du code de la santé publique (CSP).

L'arrêté du 29 mai 1997 modifié précise les conditions auxquelles doivent répondre les matériaux et objets utilisés dans les installations fixes de production, de traitement et de distribution d'EDCH. Il indique notamment que les matériaux organiques peuvent être utilisés au contact d'EDCH sous réserve qu'ils soient fabriqués à partir des constituants chimiques autorisés au titre de la réglementation relative aux matériaux et objets pouvant être placés au contact des denrées alimentaires ainsi que ceux listés en annexe III de l'arrêté.

Le chapitre « C » du guide pratique de la Direction générale de la santé (DGS) daté de mars 1999 pour la constitution des dossiers relatifs à la conformité sanitaire des matériaux placés en contact avec les EDCH, précise les éléments constitutifs du dossier de demande d'ajout d'une nouvelle substance à l'une des listes positives annexées à l'arrêté du 29 mai 1997 modifié.

Le rapport de décembre 2011 « *Positive Lists for Organic Materials* » du groupe de 4 États membres de l'Union européenne dit « 4MS », précise les informations nécessaires et décrit la procédure d'évaluation pour l'ajout d'une nouvelle substance autorisée dans la liste positive commune (4MS, 2011). La procédure est basée sur la « *Note for Guidance for Food Contact Materials* » de l'EFSA (European Food Safety Authority) (EFSA, 2008).

L'Agence a émis le 3 janvier 2013 un sursis à statuer à la demande d'autorisation d'emploi de l'isododécane (CAS : 13475-82-6 / 93685-81-5) pour la fabrication de matériaux organiques entrant au contact d'eau destinée à la consommation humaine. En effet, les résultats obtenus au cours de l'essai d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur les cellules V79 de hamster chinois (Étude RCC n°524402 du 03/06/1996) avaient montré la présence d'échanges de type chromatidien considérés comme des effets biologiquement significatifs. Cet essai ayant été réalisé sur une lignée cellulaire murine, instable sur le plan caryotypique (cellules V79 de poumon de hamster chinois), il avait été conclu que ce résultat devait être confirmé par une nouvelle étude utilisant des cellules humaines, stables sur le plan génomique. L'Agence avait demandé la répétition du test d'aberration chromosomique *in vitro* (OCDE 473) dans une étude se conformant aux règles des bonnes pratiques de laboratoire (BPL), utilisant des cellules d'origine humaine et stables sur le plan génétique, par exemple des lymphocytes humains (Avis n° 2012-SA-0143).

Le pétitionnaire a proposé de réaliser l'essai *in vitro* de micronoyaux sur des lymphocytes humains selon la ligne directrice OCDE 487, plutôt que le test d'analyse de métaphases demandé. L'essai *in vitro* de micronoyaux (OCDE 487, 2010) étant capable de mettre en évidence à la fois des phénomènes clastogènes et aneugènes, ce choix a été accepté. Par ailleurs, le groupe des « 4MS »¹ s'est accordé sur le fait que les trois tests de génotoxicité requis dans l'approche commune pouvaient être remplacés par deux tests de génotoxicité : le test d'Ames (OCDE 471) et l'essai *in vitro* de micronoyaux (OCDE 487) comme cela est notamment préconisé par l'EFSA² (EFSA, 2011) et le COM³ (COM, 2011). L'Agence a, en sus, recommandé de réaliser l'essai *in vitro* de micronoyaux préférentiellement sur cellules humaines comme préconisé dans la littérature (Honma, 2010 ; COM, 2011 ; Fowler, 2009 ; Fowler *et al.*, 2009), même si la ligne directrice OCDE 487 évoque la possibilité d'utiliser des cellules de rongeurs telles que les cellules CHO, V79, CHL et L5178Y.

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'expertise collective a été réalisée par le groupe de travail (GT) « Évaluation de l'innocuité sanitaire des matériaux et objets utilisés dans les installations fixes de production, de traitement et de distribution d'EDCH (MCDE) », sur la base d'un rapport sur le dossier technique du pétitionnaire, préparé par un expert du CES « Évaluation des risques chimiques dans les aliments (ERCA) ».

L'analyse conduite et les conclusions des travaux du GT « MCDE » ont été présentées au GT « Évaluation des substances et procédés soumis à autorisation en alimentation humaine (ESPA) » et adoptées par le CES « Eaux » le 6 mai 2014.

¹ SG-OM 13-15 : Compte-rendu de la réunion du 31 janvier 2013 du sous-groupe matériaux organiques des 4MS.

² EFSA : European Food Safety Authority.

³ COM : Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment.

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).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES EAUX

3.1. Analyse des documents reçus

Génotoxicité

- Essai *in vitro* de micronoyaux sur lymphocytes humains (Étude n° 8287-229 du 09/01/2014 réalisée par le laboratoire Covance (France), pureté de l'isododécane : 99,87 %)

Les essais *in vitro* de micronoyaux sur lymphocytes humains ont été réalisés en suivant la ligne directrice 487 de l'OCDE en absence et en présence d'activation métabolique :

- en présence d'activation métabolique, les cellules ont été traitées pendant 3 heures suivies de 21 heures ou de 45 heures de recouvrement, sans traitement ;
- en absence d'activation métabolique, les cellules ont été traitées pendant un temps court de 3 heures suivies de 21 heures ou 45 heures de recouvrement ou pendant un temps long de 20 heures suivies de 24 heures de recouvrement.

Mille cellules par culture (soit 2000/concentration) ont été examinées afin de déterminer la fréquence de cellules micronucléées.

L'isododécane testé à sa limite de solubilité (85 µg/mL) n'a induit aucune augmentation statistiquement significative de la fréquence de cellules micronucléées, aussi bien en présence qu'en absence d'activation métabolique et a donc été considéré comme non génotoxique dans ces conditions opératoires.

L'étude suit la majeure partie des recommandations des lignes directrices de l'OCDE. Néanmoins, aucun contrôle n'est fourni concernant les concentrations dans les solutions de traitement dans l'éthanol ce qui, au-delà de correspondre à une déviation aux BPL, ne permet pas de s'assurer de la stabilité du produit dans les conditions de traitement. Toutefois, cette limite n'est pas de nature à remettre en cause les conclusions de l'étude.

- Conclusion

Au-delà du type cellulaire utilisé, des différences méthodologiques importantes existent entre l'essai d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur les cellules V79 (Étude RCC n° 524402 du 03/06/1996, cf. avis n° 2012-SA-0143) et la présente étude, en particulier les concentrations réellement étudiées en termes de génotoxicité. En effet, les concentrations étudiées lors de l'essai d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur les cellules V79 étaient bien plus élevées et des échanges de type chromatidien avaient été observés aux concentrations de 500 et 3000 µg/mL en présence d'activation métabolique. Aucune mention relative à l'apparition de précipité n'avait été notée dans cette précédente étude. Or, dans l'étude complémentaire (Étude Covance 8287-229), c'est précisément la solubilité qui a été le facteur limitant avec une concentration maximale de 85 µg/mL testée en présence d'activation métabolique.

Cependant, la présente étude ayant été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE 487 (2010) et ayant utilisé des cellules humaines primaires, ses résultats prévalent sur ceux obtenus précédemment sur la lignée murine V79, déficiente en protéine p53 et génétiquement instable. L'hypothèse d'un résultat faussement positif pour cette dernière étude peut être avancée.

Au regard de l'ensemble des études de mutagénèse et de génotoxicité *in vitro*, l'isododécane n'a induit aucun effet mutagène sur bactéries (Test d'Ames, étude CCR n° 161908 du 17/01/1990, cf. avis n° 2012-SA-0143) ou sur cellules de mammifère (Test HGPRT, étude RCC n° 524401 du 27/03/1996, cf. avis n° 2012-SA-0143), ni d'effet génotoxique sur lymphocytes humains (Essai *in vitro* de micronoyaux, étude Covance n° 8287-229 du 09/01/2014). Ces trois essais *in vitro* apparaissent suffisants pour conclure que l'isododécane n'est pas génotoxique ou mutagène.

3.2. Conclusions

Au vu du dossier soumis par le pétitionnaire, le CES « Eaux » émet un avis favorable à la demande d'autorisation d'emploi de l'isododécane (CAS : 13475-82-6 / 93685-81-5) pour la fabrication de matériaux organiques entrant au contact d'eau destinée à la consommation humaine avec une concentration maximale tolérable au robinet du consommateur (CMT_{robinet}) de 2,5 µg/L.

Le CES « Eaux » rappelle l'importance d'utiliser dans la fabrication des matériaux organiques entrant au contact de l'EDCH de l'isododécane ayant le même profil d'impureté que celui utilisé pour les essais de toxicité ou de pureté supérieure.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du CES « Eaux ».

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Eau destinée à l'alimentation humaine, matériaux au contact de l'eau, matériaux organiques, listes positives, autorisation d'une substance.

BIBLIOGRAPHIE

4.1. Publications

4MS (Décembre 2011). Positive Lists for Organic Materials – 4MS Common Approach – Part A : Compilation and management of a suite of Positive Lists (PLs) for organic materials – Part B : Assessment of products for compliance with Positive List requirements (Conversion Factors – CFs).

www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/419/dokumente/4ms_positive_list_0.pdf

COM (2011). Guidance on a strategy for genotoxicity testing of chemical substances.

www.iacom.org.uk/guidstate/documents/COMGuidanceFINAL.pdf

DGS (Mars 1999). Guide pratique pour la constitution des dossiers relatifs à la conformité sanitaire des matériaux placés en contact avec les eaux d'alimentation.

www.sante.gouv.fr/fichiers/bo/1999/99-25/a0251660.htm

EFSA (30 July 2008). Note for guidance for petitioners presenting an application for the safety assessment of a substance to be used in food contact materials prior to its authorisation.

www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/21r.pdf

EFSA (2011). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal* 2011, 9(9), 2379.

www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/2379.htm

Fowler, P. (2009). Reduction of False/Misleading Positives in *in-vitro* genetic toxicology testing: Importance of cell selection and toxicity measure. *Industrial Genotoxicity Group*.

Fowler P., Williams K., Jeffrey L., Carmichael P., Ardema M., Diembeck W., Fautz R., Harvey J., Hewitt N., Latil A. *et al.* (2009). Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays I. Choice of cell type. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 50, 572.

Honma M., Hayashi M. (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen.*, 52(5), 373-84.

4.2. Normes

OCDE 487 (22 juillet 2010). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques – Essai *in vitro* de micronoyaux sur cellules de mammifères.

4.3. Législation et réglementation

Arrêté du 29 mai 1997 relatif aux matériaux et objets utilisés dans les installations fixes de production, de traitement et de distribution d'eau destinée à la consommation humaine modifié par les arrêtés du 24 juin 1998, 13 janvier 2000, 22 août 2002 et 16 septembre 2004 (publiés aux Journaux Officiels des 1^{er} juin 1997, 25 août 1998, 21 janvier 2000, 3 septembre 2002 et 23 octobre 2004).