

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 12 avril 2019

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

relatif aux risques liés à l'ingestion de l'additif alimentaire E171

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 28 février 2019 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, la Direction générale de la santé, la Direction générale de l'alimentation et la Direction générale de la prévention des risques pour rendre un appui scientifique et technique sur les risques liés à l'ingestion de l'additif alimentaire E171.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le E171 est un additif alimentaire utilisé en tant que colorant. Il se présente sous la forme d'un mélange de particules de dioxyde de titane (TiO₂) à l'état dispersé, agrégé ou aggloméré dont la taille varie de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres. Les données de la littérature indiquent que la proportion de particules considérées comme nanoparticules (*i.e.* dont les trois dimensions sont inférieures ou égales à 100 nm) au sein de l'additif alimentaire E171 est très variable selon les lots du commerce. D'après les données de la littérature, cette proportion peut varier de 6 à 55% (25% en moyenne, voir annexe 2) en nombre et peut atteindre jusqu'à 3,2% en masse (Efsa 2016).

Ainsi, d'après la recommandation de définition proposée par la Commission européenne¹, le E171 n'est pas considéré comme un nanomatériau car le nombre de particules ayant une ou plusieurs dimensions externes dans la gamme comprise entre 1-100 nm représente, pour la majorité des lots de E171 du marché, moins de 50% de la population totale des particules. Cependant, selon

¹ D'après la recommandation de définition de la Commission européenne datée du 18 octobre 2011, les nanomatériaux sont définis comme des matériaux naturels, accidentels ou manufacturés contenant des particules à l'état libre, agrégé ou aggloméré et dont plus de 50 % du nombre de particules présentent une ou plusieurs dimensions comprises entre 1 et 100 nm.

les définitions rapportées dans le règlement INCO² et Novel Food³, le E171 est, dans ces contextes réglementaires, considéré comme un nanomatériau.

Au cours des dernières années, différentes études ont porté sur le TiO₂ à l'échelle nationale et européenne pour différentes voies d'exposition : par inhalation (voie pulmonaire) et par ingestion (voie orale).

S'agissant de la voie pulmonaire, en 2006, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé le TiO₂ dans le groupe des substances « cancérogènes possibles chez l'Homme (2B) » pour cette voie.

L'apparition de tumeurs pulmonaires chez le rat après inhalation ou instillation de TiO₂ a amené l'Anses, le 20 mai 2015, à soumettre à l'agence européenne des produits chimiques (ECHA) une proposition de classement du TiO₂ en tant que substance cancérogène de catégorie 1B (substance dont le potentiel cancérogène pour l'être humain est supposé) par voie pulmonaire, dans le cadre du règlement CLP. Cette proposition tend à couvrir le TiO₂ sous toutes ses phases cristallines et combinaisons de phases, les tailles inférieures à 10 µm et toutes les morphologies de particules. Sur la base de cette proposition, le Comité d'évaluation des risques de l'ECHA a adopté un avis le 9 juin 2017, dans lequel il conclut que le TiO₂ remplit les critères pour une classification en catégorie 2, en tant que cancérogène suspecté par inhalation pour l'Homme⁴.

Dans le cadre de sa mission nationale d'élaboration de valeurs sanitaires de référence, l'Anses a été chargée de définir une Valeur Toxicologique de Référence (VTR) pour le TiO₂ sous forme nanoparticulaire. L'Agence recommande une VTR chronique par inhalation pour la forme P25 du TiO₂ sous forme nanoparticulaire de 0,12 µg.m⁻³ (Anses 2019).

S'agissant de la voie orale, en 2016, l'autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa) a publié un avis relatif à la réévaluation du E171 (Efsa, 2016) en tant qu'additif alimentaire sur la base d'une revue détaillée des données de la littérature relatives aux particules de TiO₂ ainsi que sur des données (fournies par les industriels) relatives à des niveaux d'incorporation (ou mesurés) du E171 pour certaines denrées alimentaires. Cet avis conclut que les expositions actuelles des consommateurs au E171 dans ses utilisations alimentaires ne sont pas de nature à entraîner un risque sanitaire.

En 2017, l'Anses a rendu un avis (2017-SA-0020) relatif à une étude (Bettini *et al.* 2017) menée chez le rat exposé par voie orale à du E171 ou à des nanoparticules de TiO₂. Dans cette étude, les auteurs ont étudié : le passage et la distribution de TiO₂ dans quelques organes cibles, les effets génotoxiques et inflammatoires du TiO₂ au niveau intestinal ainsi que les effets d'initiation et de promotion de lésions prénéoplasiques au niveau du côlon. Le groupe d'experts a conclu que cette étude mettait en lumière de nouvelles informations relatives à la caractérisation du danger du E171 (voir la partie 3.4.2) mais ne remettait pas en cause les conclusions de l'Efsa de 2016 concernant l'évaluation du risque du E171.

En 2018, l'Efsa (Efsa 2018) a examiné quatre nouvelles études relatives à la caractérisation du danger de l'additif alimentaire E171 et de nanoparticules de TiO₂, parmi lesquelles l'étude Bettini *et al.* (2017) objet de l'avis ci-dessus. Le groupe d'experts a conclu que ces études pouvaient être utiles pour la caractérisation du danger du TiO₂. Néanmoins, le groupe d'experts a jugé que les incertitudes relevées pour chacune de ces études ne permettaient pas leur utilisation dans le cadre

² Règlement (UE) n° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011.

³ Règlement (CE) n° 258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires

⁴ <https://echa.europa.eu/fr/-/titanium-dioxide-proposed-to-be-classified-as-suspected-of-causing-cancer-when-inhaled>

d'une évaluation du risque Dans ce contexte, l'Efsa n'a pas considéré comme justifié, au vu des résultats de ces études, de ré-ouvrir le dossier d'évaluation du E171 (Efsa 2016).

Au vu des recommandations d'études émises par l'Efsa (2016) et l'Anses (2017) et des dernières publications relatives à la caractérisation du danger de l'additif alimentaire E171, il est demandé à l'Anses :

1°) de recenser les études de toxicologie par voie orale réalisées depuis la publication des résultats de l'INRA en 2017 (Bettini *et al.* 2017).

2°) d'actualiser, en tant que de besoin, sur la base des résultats de ces nouvelles études, les recommandations qu'elle avait formulées en 2017 (Anses 2017).

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) ».

Compte tenu du délai imparti pour procéder à l'expertise, l'Anses a retenu de la confier à un groupe d'expertise collective en urgence (GECU) « TiO₂ » constitué *ad hoc*. Le GECU s'est réuni le 12 mars, le 25 mars et le 5 avril 2019, sur la base de rapports d'expertise préparés par les experts du GECU. Ces travaux ont été adoptés par le GECU le 5 avril 2019. Compte tenu du calendrier, les travaux du GECU ont pu être présentés au comité d'experts spécialisé « évaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA) le 11 avril 2019.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

Afin de répondre à la demande, le GECU a effectué une recherche bibliographique de publications relatives à la caractérisation du danger de l'additif alimentaire E171. Dans cette optique, la recherche bibliographique a été réalisée dans les bases de données Scopus et PubMed avec les mots clés suivants : ("E171" or "food grade TiO₂" or "food-grade TiO₂" or "food grade titanium dioxide" or "food-grade titanium dioxide" or "food grade TiO₂ nanomaterial" or "food-grade TiO₂ nanomaterial" or "food grade titanium dioxide nanomaterial" or "food-grade titanium dioxide nanomaterial" or "food grade TiO₂ nanoparticle" or "food-grade TiO₂ nanoparticle" or "food grade titanium dioxide nanoparticle" or "food-grade titanium dioxide nanoparticle") and (toxicity or toxicology or cytotoxicity or immunotoxicity or genotoxicity or toxic or neoplastic or preneoplastic or carcinogenesis).

Suite à cette recherche bibliographique, le GECU a défini des critères de sélection des études pertinentes au regard de la demande. L'ensemble des critères ci-dessous ont été appliqués :

- La substance utilisée dans les systèmes d'études est clairement identifiée comme étant l'additif alimentaire E171 ou un dioxyde de titane de qualité alimentaire ;
- Le E171 ou le dioxyde de titane de qualité alimentaire est caractérisé d'un point de vue physico-chimique ;
- Les études *in vivo* ont été réalisées par voie orale ;
- L'étude a été publiée entre 2017 et 2019.

Ont donc été exclues les études pour lesquelles:

- La substance utilisée n'est pas l'additif alimentaire E171 ou du dioxyde de titane de grade alimentaire ;
- Les voies d'exposition étudiées sont les voies respiratoires ou cutanées ;

- La publication est antérieure à 2017 (année de publication du dernier avis de l'Anses relatif au E171).

L'application de ces critères a conduit le GECU à retenir 25 publications (voir les références bibliographiques en fin de document).

Bien que la demande porte sur la mise à jour des données relatives aux études toxicologiques, le GECU a également considéré les articles relatifs à la caractérisation et au comportement du E171 dans des simulants biologiques et alimentaires. Ces données complémentaires aux études toxicologiques peuvent fournir des éléments de compréhension quant aux mécanismes d'interaction ou d'accumulation des particules dans certains compartiments biologiques.

Enfin, le GECU a décidé d'intégrer, en plus de la mise à jour des données toxicologiques, des données d'occurrence du E171 pour certaines catégories alimentaires (Annexe 1). Deux types de données ont été considérés : des quantités d'incorporation du E171 lors de la formulation des denrées alimentaires (données fournies par les industriels) ainsi que des données analytiques de quantification du E171 au sein de différentes catégories alimentaires (données issues de la littérature, des ONG et des contrôles menés par la DGCCRF).

3. ANALYSES ET CONCLUSIONS DU GECU

3.1. L'additif alimentaire E171

L'additif alimentaire E171 est constitué de particules de dioxyde de titane (TiO₂, numéro CAS: 13463-67-7). Le TiO₂ est une substance inorganique présente sous deux formes cristallines majoritaires (anatase et rutile) et dont la masse molaire est de 79,88 g/mol. Le E171 se présente sous la forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau et les solvants organiques mais soluble dans l'acide fluorhydrique et l'acide sulfurique concentré à chaud. Les données de la littérature indiquent une grande variabilité concernant la proportion des phases cristallines et la distribution en taille des particules des différents lots de E171 présents dans le commerce (Yang *et al.* 2014 ; EFSA 2016). La taille des particules peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres sous une forme dispersée, agrégée ou agglomérée. Le pourcentage de particules considérées comme nanoparticulaires (*i.e.* dont les 3 dimensions sont inférieures ou égales à 100 nm) varie, selon les données de la littérature, de 6 à 55% en nombre (voir partie 3.7) et de 0 à 3,2% en masse d'après l'avis de Efsa (2016).

L'additif alimentaire E171 est majoritairement utilisé en tant que colorant alimentaire, les niveaux maximaux d'incorporation sont définis au sein du règlement (CE) n°1333/2008 relatif aux additifs alimentaires. Ainsi, pour 51 catégories d'aliments, le E171 peut être utilisé *quantum satis*⁵.

3.2. Les usages de l'additif alimentaire E171

L'additif alimentaire E171 est largement utilisé en tant que colorant dans différentes catégories alimentaires. En France, le E171 est notamment utilisé dans la production de confiseries, de desserts et crèmes glacés, de produits de boulangerie et pâtisserie, de biscuits, de gâteaux, de tablettes de chocolat, de desserts réfrigérés, etc. (source GNPD⁶).

⁵ L'article 3 (2) du règlement n°1333/2008 précise que '*quantum satis*' signifie qu'aucun niveau maximal n'est spécifié. La substance peut être utilisée en accord avec les bonnes pratiques de fabrication en ne dépassant pas le niveau requis pour atteindre l'objectif technologique.

⁶ Global New Products Database.

Le TiO₂ n'apparaît pas (depuis 2015) dans le secteur des utilisations « fabrication de produits alimentaires » dans l'outil de déclaration R-nano exploité par l'Anses dans un cadre réglementaire pour le compte de ses ministères de tutelles.

3.3. Réglementation

Les nanomatériaux sont réglementés en fonction de leurs usages. En 2018, la Commission européenne a adopté la révision des annexes des dossiers d'enregistrements des substances sous formes nanoparticulaires. Cette révision clarifie les exigences à fournir en matière d'information et d'identification des substances nanoparticulaires. Ces nouvelles règles entreront en vigueur le 1^{er} janvier 2020.

Par ailleurs, la Commission européenne travaille à une nouvelle définition des nanomatériaux pour remplacer celle du 18 octobre 2011⁷.

Les règlements relatifs aux cosmétiques⁸, aux biocides⁹ et à l'alimentation (INCO¹⁰ et novel food¹¹) stipulent l'obligation d'étiquetage des produits contenant des nanomatériaux avec la mention [nano]. Dans le domaine de l'alimentation, les règlements INCO et novel food proposent pour définir les nanomatériaux manufacturés la définition suivante: « *nanomatériaux manufacturés : tout matériau produit intentionnellement présentant une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, ou composé de parties fonctionnelles distinctes, soit internes, soit à la surface, dont beaucoup ont une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, y compris des structures, des agglomérats ou des agrégats qui peuvent avoir une taille supérieure à 100 nm mais qui conservent des propriétés typiques de la nanoéchelle* ».

3.4. Résumés des évaluations relatives à l'additif alimentaire E171

3.4.1. Résumé de l'avis de l'Efsa relatif à la réévaluation du E171 (2016)

En 2016, l'autorité européenne de sécurité des aliments a publié un avis relatif à la réévaluation de l'additif alimentaire E171 (Efsa, 2016) sur la base d'une revue détaillée des données de la littérature relatives aux particules de TiO₂. Concernant les données disponibles sur l'absorption, la distribution et l'excrétion, le groupe d'experts de l'Efsa a conclu que l'absorption du TiO₂ est extrêmement faible suite à son administration par voie orale et qu'une faible quantité de TiO₂ (au maximum 0,1% de la dose administrée) est absorbée au niveau du tissu lymphoïde intestinal. Suite à son absorption, le TiO₂ est distribué dans différents organes présentant chacun des taux d'accumulation et d'élimination variables. Cependant, la grande majorité du TiO₂ est éliminée dans les fèces.

De nombreuses études de génotoxicité *in vivo* et *in vitro* basées sur des tests d'aberration chromosomique, sur le potentiel mutagène, sur les dommages à l'ADN y compris les oxydations

⁷ Recommandation de la commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux

⁸ Règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques.

⁹ Règlement (UE) n°528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.

¹⁰ Règlement (UE) n°1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, modifiant les règlements (CE) n°1924/2006 et (CE) n°1925/2006 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 87/250/CEE de la Commission, la directive 90/496/CEE du Conseil, la directive 1999/10/CE de la Commission, la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil, les directives 2002/67/CE et 2008/5/CE de la Commission et le règlement (CE) n°608/2004 de la Commission.

¹¹ Règlement (UE) n°2015/2283 du Parlement européen et du Conseil du 25 novembre 2015 relatif aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) n°1169/2011 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) n°258/97 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n°1852/2001 de la Commission.

de bases, ont été rapportées pour différentes tailles et cristallinités de particules de TiO₂ et donnent des résultats contradictoires. Néanmoins, le panel d'experts de l'Efsa rappelle que la fiabilité du test relatif aux dommages à l'ADN (test des comètes) a été remise en question lors de son application avec des nanomatériaux. En effet, des études soulignent le fait que les dommages à l'ADN sont causés par les nanoparticules de TiO₂ durant les étapes post traitement et non pas durant le traitement lui-même. Le panel remet également en cause la fiabilité de certains résultats positifs observés pour des études *in vivo* et *in vitro* dans lesquelles la variation des paramètres expérimentaux peut affecter la stabilité des particules modifiant ainsi leur biodisponibilité et leur activité biologique.

L'avis de l'Efsa (2016) conclut « en se basant sur les données d'absorption, de distribution et d'excrétion ainsi que sur les données de génotoxicité, que les particules (nano et micrométriques) de TiO₂ ingérées par voie orale ne présentent pas de préoccupation génotoxique *in vivo* ».

Concernant les études de toxicité liées à la reproduction, le E171 ne semble pas présenter d'effets adverses contrairement au TiO₂ n'étant pas de qualité alimentaire pour lequel des résultats contradictoires ont été rapportés, notamment sur la variation des niveaux hormonaux. Cependant, des lacunes ont été relevées concernant la méthodologie mise en place pour ces études. En raison de l'absence de données robustes concernant la toxicité liée à la reproduction, le groupe d'experts de l'Efsa n'a pas été en mesure de conclure sur cet effet ni de fixer une valeur toxicologique de référence.

En ce qui concerne les effets immunotoxiques du TiO₂, le panel de l'Efsa a considéré qu'en l'absence d'une caractérisation adéquate du matériel utilisé dans les différentes études disponibles et au vu des différences dans les effets rapportés selon diverses voies d'administration et la diversité des effets observés, il n'est pas possible de conclure sur les éventuels effets immunotoxiques de l'additif alimentaire E 171.

Des études de cancérogenèse réalisées avant 1979 (NTP 1979) ont été menées sur du TiO₂ Unitane® (forme anatase) chez des souris B6C3F1 (50 individus/sexe) à des doses allant de 0 à 6 500 mg de TiO₂.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les mâles et de 0 à 8 350 mg de TiO₂.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les femelles pendant 103 semaines *via* l'alimentation. Des observations histopathologiques ont été réalisées sur une trentaine d'organes. Les résultats indiquent que le TiO₂ administré oralement à ces doses n'est pas cancérogène chez les souris. Des études identiques ont été menées chez le rat (50 individus/sexe) à des doses allant de 0 à 2 250 mg de TiO₂.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les mâles et de 0 à 2 900 mg de TiO₂.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les femelles pendant 103 semaines *via* l'alimentation. Des observations histopathologiques ont également été réalisées sur une trentaine d'organes. Les résultats indiquent que le TiO₂ administré par voie orale (*via* les aliments) n'est pas cancérogène chez le rat à cette gamme de doses. A partir de ces études de cancérogenèse menées chez le rat et la souris, le groupe d'experts de l'Efsa a fixé la dose sans effet nocif observable à 2 250 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

Concernant les données d'exposition, le panel de l'Efsa a élaboré différents *scenarii* d'exposition à partir des données fournies par les industriels et les Etats membres. Le scénario d'exposition maximaliste prend en considération les valeurs maximales d'utilisation (ou mesurées) rapportées par l'industrie pour les aliments (dont les données sont connues) susceptibles de contenir du E171. La valeur moyenne d'exposition calculée concernant les nourrissons et les personnes âgées est de 0,4 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (1,2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ au 95^{ème} centile) et de 10,4 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (32,4 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ au 95^{ème} centile) pour les enfants. Ce scénario est considéré comme étant le plus protecteur puisqu'il considère une exposition vie entière à des teneurs d'incorporation (ou mesurées) maximales de E171.

L'Efsa a également déterminé deux *scenarii* d'exposition affinés. Dans le premier scénario, qui prend en compte la fidélité aux marques alimentaires, il est supposé que la population est exposée sur le long terme à des teneurs maximales d'incorporation (ou mesurées) d'additifs alimentaires

pour une catégorie d'aliment et à une teneur moyenne pour les autres catégories d'aliments. La valeur moyenne d'exposition calculée concernant les nourrissons et les personnes âgées est de $0,4 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ($1,1 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ au 95^{ème} centile) et de $8,8 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ($30,2 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ au 95^{ème} centile) pour les enfants.

Le second scénario ne prend pas en compte la fidélité aux marques et il est supposé que la population est exposée sur le long terme à des teneurs moyennes d'incorporation (ou mesurées) d'additifs alimentaires pour l'ensemble des catégories d'aliments. La valeur moyenne concernant les nourrissons et les personnes âgées est de $0,2 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ($0,5 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ au 95^{ème} centile) et de $5,5 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ($14,8 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ au 95^{ème} centile) pour les enfants.

Le panel a considéré le scénario ne prenant pas en compte la fidélité aux marques comme étant le scénario le plus approprié et réaliste pour l'évaluation du risque car il est supposé que la population sera exposée au long terme à des additifs alimentaires présents à une valeur d'utilisation moyenne dans les aliments.

Ainsi, la marge de sécurité la plus basse calculée à partir de la dose sans effet nocif observable de $2\,250 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ est de 150. D'après le panel d'experts de l'Efsa, cette marge de sécurité est jugée non préoccupante (car supérieure à 100, pour les composés non génotoxiques et non cancérigènes au regard des lignes directrices relatives aux additifs alimentaires, Efsa, 2012).

Dans son avis, le groupe d'experts de l'Efsa a émis les recommandations suivantes :

- Dans l'optique d'établir une valeur toxicologique de référence pour l'additif alimentaire E171, une étude sur une génération étendue ou multigénérationnelles, respectant les lignes directrices de l'OCDE, devrait être menée avec de l'additif alimentaire E171 conforme aux spécifications de l'UE et dont la distribution en taille serait préalablement caractérisée ;
- Les spécifications de l'UE relatives au E171 devrait inclure la caractérisation de la distribution en taille des particules de TiO_2 (gamme, médiane, quartiles) en utilisant les outils statistiques adaptés ainsi que le pourcentage (en nombre et en masse) des nanoparticules utilisées en tant qu'additif alimentaire. Les méthodes de mesures devront être en accord avec le document guide de l'Efsa¹² ;
- Les limites maximales concernant les impuretés d'éléments toxiques (arsenic, mercure, cadmium et plomb) mentionnées dans les spécifications de l'UE pour le TiO_2 devraient être révisées afin d'assurer que le E171 ne soit pas une source significative d'exposition à ces éléments.

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

3.4.2. Résumé de l'avis Anses relatif à l'analyse de la publication de Bettini et al. (2017)

Dans l'article de Bettini *et al.* (2017), des groupes de rats ont été exposés pendant 7 jours (par gavage) ou 100 jours (par administration dans l'eau de boisson) à un lot de E171 (redispersé par ultrasonication en solution de sérum albumine bovine (BSA)) ou à des nanoparticules de TiO_2 de référence (NM-105, Joint Research Center JRC), uniquement utilisées pour l'exposition sur 7 jours, à des doses du même ordre de grandeur que celles observées pour l'exposition humaine. Les auteurs se sont intéressés au passage de la barrière intestinale, à la distribution dans

¹² Efsa Scientific Committee, 2011. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. EFSA Journal 2011; 9(5): 2140, 36 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2140. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm

quelques organes, à la variation de paramètres immunologiques ainsi qu'au potentiel génotoxique et cancérigène (initiation, promotion) du TiO₂.

Les deux matériaux (E171 et NM-105) ont fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique puis, avant utilisations, ont été dispersés en solution de BSA (0,05% m/v) par ultrasonication en suivant un protocole dérivé de celui décrit dans les rapports du programme européen Nanogenotox¹³. Cette préparation de E171 peut apparaître comme peu représentative de l'additif alimentaire E171 tel que présent dans les aliments mais permet d'identifier certains dangers associés à des usages du E171.

Les paramètres et les outils de caractérisation physico-chimique utilisés apparaissent pertinents et la caractérisation physico-chimique très complète. Concernant les mesures de taille, le NM-105 présente, au microscope électronique à transmission (TEM), un diamètre particulaire moyen de 22 ± 1 nm (gamme comprise entre 10 et 45 nm). La distribution granulométrique primaire déterminée par TEM variait de 20 à 340 nm (moyenne et écart-type de 118 ± 53 nm) et 44,7 % des particules avaient des tailles inférieures à 100 nm de diamètre. Les images obtenues au TEM montrent que les particules issues du lot de E171 présentent une forme sphérique, et sont en partie isolées ou sous la forme de petits agglomérats lorsqu'elles sont dispersées dans l'eau avant l'administration orale chez le rat par gavage ou *via* l'eau de boisson. Les caractéristiques physico-chimiques (forme cristalline, distribution en taille, fraction nanométrique) du E171 sélectionné par Bettini *et al.* sont celles majoritairement rapportées pour d'autres lots de E171 de qualité alimentaire et apparaissent donc comme représentatives du marché.

Suite au protocole de dispersion du E171 et du NM-105, deux voies d'exposition orale ont été utilisées dans cette étude. Dans la première, des rats ont été exposés pendant 7 jours par gavage intra gastrique à la dose de E171 et de NM-105 de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Dans la seconde, des rats ont été exposés pendant 100 jours *via* l'eau de boisson, renouvelée tous les 2 jours, à des doses de E171 de $200 \text{ } \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Concernant les résultats relatifs à l'immunotoxicité, les auteurs se sont intéressés au suivi de différents paramètres : la variation du nombre de cellules dendritiques (CD) et de lymphocytes (Tregs et Th), l'évolution de la concentration de plusieurs cytokines (TNF- α , IL-10, IL-1 β , IFN- γ , IL-17, IL-8, IL-6, IL-18), la prolifération et la cytotoxicité des lymphocytes. Dans l'ensemble, les pourcentages de variations rapportés dans cette étude, lorsqu'ils sont statistiquement significatifs, restent relativement faibles et leur signification biologique reste à confirmer. Par ailleurs, les interprétations données par les auteurs sont des hypothèses de travail possibles mais celles-ci ne sont pas totalement étayées par les résultats. Ainsi, bien que ces résultats soulignent des modifications pour certains paramètres immunitaires, ils ne sont pas suffisants pour affirmer une déficience (« impairment ») de l'homéostasie immunitaire. En conclusion, en ce qui concerne les aspects inflammatoires et immuno-modulateurs, les évaluations actuellement disponibles pour le E171 utilisé en tant qu'additif alimentaire ne sont pas remises en question par les données de cette étude.

La génotoxicité a été étudiée *via* un test des comètes réalisé sur des cellules des plaques de Peyer après 7 jours d'exposition au E171 ou au NM-105 à une dose de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Les auteurs de l'étude n'observent pas d'effet génotoxique sur les cellules isolées des plaques de Peyer de rats exposés pendant 7 jours au E171 ou au NM-105. Néanmoins, des incertitudes liées aux protocoles expérimentaux (absence de témoin positif, nombre de doses testées, choix des cellules) ne permettent pas d'évaluer la pertinence de cette étude.

Les études d'un potentiel cancérigène ont porté sur l'apparition et l'évolution de foyers de cryptes aberrantes (FCA) chez des rats, induits ou non par un initiateur, exposés *via* l'eau de boisson à du

¹³ https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES-Ft-Nanogenotox_FinalReport.pdf

E171 (préalablement redispersé en BSA et ultrasoniqué) pendant 100 jours. Ces FCA sont considérés par les auteurs comme étant les lésions histopathologiques les plus précoces en lien avec la formation du cancer colorectal.

Afin d'étudier l'impact du E171 sur la promotion de FCA, des rats Wistar mâles adultes ont été prétraités avec une injection intrapéritonéale de 1,2-diméthylhydrazine (DMH) à une dose de 180 mg.kg pc⁻¹ afin d'initier le processus de cancérogenèse au niveau du côlon. Sept jours après le traitement, les rats ont été répartis de manière aléatoire en 3 groupes de 12 rats puis ont été exposés à des doses de 0 (contrôle, eau seulement), 200 µg de E171.kg pc⁻¹.j⁻¹ ou 10 mg de E171.kg pc⁻¹.j⁻¹ dans de l'eau de boisson pendant 100 jours. Les auteurs n'ont pas observé d'augmentation significative du nombre total de FCA par côlon aux deux doses testées par rapport au contrôle. Cependant, des augmentations statistiquement significatives du nombre de cryptes aberrantes par côlon et du nombre de « grands FCA » par côlon ont été observées exclusivement dans le groupe de rats exposé à 10 mg de E171.kg pc⁻¹.j⁻¹.

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans les potentiels effets promoteurs observés, des études *in vitro* relatives à la cytotoxicité du E171 sur des cellules épithéliales coliques de rat normales (gène Apc non muté (Apc +/+)) ou prénéoplasiques (gène Apc muté (Apc min/+)) ont été menées. D'après les auteurs, l'exposition au NM-105 induit une cytotoxicité préférentielle vis-à-vis des cellules prénéoplasiques. Ainsi, l'hypothèse mécanistique d'une sélection de cellules prénéoplasiques aux premiers stades du processus de transformation est avancée par les auteurs. Afin d'étudier la capacité du E171 à initier l'apparition spontanée de FCA, des rats Wistar mâles adultes sont exposés à des doses de 0 (contrôle, eau seulement) ou 10 mg de E171.kg pc⁻¹.j⁻¹ dans de l'eau de boisson pendant 100 jours. Parmi les animaux exposés au E171 à la dose de 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, quatre rats sur onze présentaient des FCA dans le côlon, alors qu'aucun des 12 rats du groupe contrôle n'en comportait, la différence entre les deux groupes étant statistiquement significative. Pour trois des quatre rats, le nombre de cryptes aberrantes par foyer était faible (1 à 3). Pour le quatrième rat, un foyer de plus de 12 cryptes aberrantes a été observé, ce qui dénote une lésion plus sévère.

Les membres du GECU de 2017 ont considéré que la méthodologie employée par les auteurs avait suivi un modèle scientifiquement bien établi.

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

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

Dans son avis, l'Anses a émis les recommandations suivantes :

L'effet promoteur potentiel du E171 observé au niveau du côlon nécessite d'être confirmé par des expérimentations intégrant l'utilisation de biomarqueurs supplémentaires et/ou portant sur des durées d'expositions plus longues afin d'évaluer l'induction tumorale. Un groupe supplémentaire composé d'un plus grand nombre d'animaux est nécessaire afin de confirmer ou d'infirmer un possible effet initiateur du E171.

l'Anses a également rappelé :

- La nécessité de conduire, selon des modalités et un calendrier à définir, les études nécessaires à la parfaite caractérisation du danger associé au E171 ;
- Que les études recommandées dans l'avis Anses (2017), ainsi que celles mentionnées précédemment par l'Efsa, devront être réalisées avec un nombre suffisant d'animaux par groupe de doses et dans un environnement permettant d'assurer la bonne conduite de l'expérimentation selon les bonnes pratiques de laboratoire. L'acquisition, à terme, de données complémentaires propres à statuer sur les signaux observés est essentielle dans un contexte d'usage large et quantum satis d'un additif alimentaire dépourvu de DJA ;
- La nécessité de développer des protocoles d'étude de toxicologie pertinents pour évaluer les risques sanitaires des produits contenant des nanomatériaux (bonne caractérisation physico-chimique, protocole détaillé et reproductible, participation des sciences humaines et sociales etc.) ;
- Dès lors que des dangers sont identifiés pour la santé humaine ou pour l'environnement, l'Agence recommande de peser l'utilité, pour le consommateur ou la collectivité, de la mise sur le marché de tels produits contenant des nanomatériaux, pour lesquels les bénéfices devraient être clairement démontrés ;
- Sa recommandation de limiter l'exposition des salariés, des consommateurs et de l'environnement dans le cadre d'une approche graduelle, notamment en favorisant les produits sûrs, dépourvus de nanomatériaux, et équivalents en termes de fonction, d'efficacité et de coût ;
- Les enjeux de renforcement de la traçabilité des produits de consommation contenant des nanomatériaux, essentiels aux travaux d'évaluation des risques. L'Anses souligne dans ce contexte les enjeux associés à l'amélioration du processus de déclaration mis en œuvre dans le cadre du portail national R-nano afin d'assurer une meilleure description des nanomatériaux mis sur le marché, de leurs usages précis et des expositions de la population qui leurs sont associées.

3.4.3. Résumé de l'avis de l'Efsa (2018) relatif à l'analyse de quatre nouvelles publications non considérées lors de la réévaluation du E171 en 2016

En 2018, la Commission européenne a saisi l'Efsa afin d'évaluer quatre nouvelles études (Heringa *et al.* 2016, Bettini *et al.* 2017, Guo *et al.* 2017 et Proquin *et al.* 2017) relatives à la toxicité du TiO₂ en tant qu'additif alimentaire et d'indiquer si ces études justifient la réouverture du dossier d'évaluation du E171 datant de 2016.

Dans l'étude de Guo *et al.* (2017), des cellules modèles Caco-2 et HT29-MT (mimant des cellules épithéliales de l'intestin) ont été exposées à des nanoparticules de TiO₂ (20-40 nm). Les auteurs suggèrent qu'à des concentrations physiologiques pertinentes (reflétant des niveaux d'exposition chez l'Homme), des nanoparticules de TiO₂ peuvent favoriser la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au sein d'un modèle d'intestin *in vitro* induisant ainsi des signalisations pro-inflammatoire pouvant impacter le bon fonctionnement des cellules épithéliales de l'intestin. Le groupe d'experts de l'Efsa a conclu que les nanoparticules de TiO₂ utilisées dans cette étude n'étaient pas représentatives de l'additif alimentaire E171 et que les résultats observés dans ce modèle d'intestin *in vitro* étaient difficilement transposables à l'Homme.

Pour l'étude de Bettini *et al.* de 2017 (dont les détails sont rapportés dans la partie 3.4.2), le groupe d'experts de l'Efsa, estime que : (i) l'administration de E171 par l'eau de boisson ou par gavage n'est pas représentative de l'usage du E171 dans les matrices alimentaires ; (ii) les variations des biomarqueurs immunologiques ne sont pas biologiquement significatives ; (iii) l'utilisation des foyers de cryptes aberrantes (FCA) comme seuls biomarqueurs n'est pas suffisante pour l'étude des lésions pré néoplasiques dans le colon, (iv) le potentiel d'initiation du E171 a été

observé sur un faible nombre d'animaux et n'a pas été confirmé dans d'autres études (Urrutia-Ortega et al. 2016).

Dans l'étude de Proquin *et al.* (2017), les auteurs ont évalué la cytotoxicité, la génération de ROS et la génotoxicité *in vitro* du TiO₂ sur deux lignés cellulaires (Caco-2 et HCT116). Pour cela les auteurs ont utilisé trois formes de TiO₂ : du E171 ainsi que des particules micro et nanométriques. Les trois matériaux ont entraîné de la cytotoxicité à des doses de 1 000 µg/mL et à partir de 100 µg/mL pour le E171. Le nano-TiO₂ et le E171 ont généré des ROS mais la présence de BSA dans le milieu a inhibé la production des ROS. Pour les auteurs, cette inhibition semble liée à la formation de la corona¹⁴ à la surface des particules. Les auteurs ont également montré que les trois matériaux testés entraînaient des dommages à l'ADN et que le E171 pouvait interagir avec les chromosomes et l'appareil mitotique. Le groupe d'experts de l'Efsa estime que cette étude est utile pour l'identification du danger mais n'est pas adaptée à l'évaluation du risque et ne remet pas en cause les conclusions de l'Efsa (2016) concernant les effets génotoxiques du TiO₂. Il estime également que l'absorption cellulaire des particules de TiO₂ pourrait diminuer dans des conditions *in vivo* du fait de la présence de mucus à la surface des cellules épithéliales. Le groupe d'experts de l'Efsa évoque enfin des études similaires (Vila *et al.* 2018) menées sur des cellules Caco-2 différenciées montrant des résultats contradictoires à ceux présentés dans l'étude de Proquin *et al.* (2017) (sur cellules Caco-2 non différenciées).

Dans l'étude d'Heringa *et al.* (2016) les auteurs ont fait un exercice d'évaluation des risques du E171 pour l'Homme et mettent l'accent sur les lacunes des connaissances notamment concernant : la concentration de nano-TiO₂ dans différents organes, les effets sur les organes reproducteurs, la toxicité liée à la reproduction et la perturbation endocrine. Ce point sera pris en compte par l'Efsa (2018) qui recommande la conduite d'une étude étendue de toxicité du E171 pour la reproduction sur une génération (OERTGS, ligne directrice OCDE n°443), ainsi qu'une meilleure évaluation du E171 et des nanoparticules de TiO₂ qui tiendrait compte des interactions avec les matrices alimentaires. Le groupe d'experts de l'Efsa estime que les incertitudes évoquées par les auteurs ne permettent pas de mettre en place une évaluation du risque du E171.

Le groupe d'experts de l'Efsa conclut que ces quatre études mettent en lumière de nouveaux effets *in vitro* et *in vivo* utiles pour l'identification du danger du E171. Néanmoins, selon l'Efsa, les incertitudes inhérentes à chacune des études ne permettent pas d'utiliser ces données pour l'évaluation du risque du E171 ni ne justifient la réouverture du dossier d'évaluation de l'additif alimentaire E171.

Commentaire du GECU sur l'avis Efsa (2018)

D'après le groupe d'experts de l'Efsa, les résultats de Bettini *et al.* (2017) ne justifient pas la mise en place d'une étude de cancérogénicité. L'Efsa appuie ses conclusions en se référant à l'étude de Wijnands *et al.* (2004). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que la taille et le nombre de FCA n'est pas un indicateur prédictif d'un état préneoplasique ni du nombre de tumeurs colorectales. Pour le GECU, cet argumentaire est discutable car l'étude de Wijnands *et al.* souffre de failles méthodologiques et conceptuelles : le dénombrement des FCA et leur caractérisation ne sont pas décrits (surface, localisation des segments de côlon). Ainsi, le GECU estime que cette étude ne permet pas de conclure quant au caractère non prédictif des FCA vis-à-vis d'un état préneoplasique ou du nombre de tumeurs colorectales.

¹⁴ La corona est la couche de biomolécules adsorbées à la surface des particules

3.5. Analyse des publications relatives à la toxicologie de l'additif alimentaire E171

Les publications identifiées et sélectionnées selon les modalités précisées dans la partie 2 figurent dans l'annexe « Bibliographie » en fin d'avis. Concernant les revues scientifiques issues de la recherche bibliographique, le GECU n'a pas expertisé chacune des publications mentionnées dans ces revues mais s'est intéressé uniquement aux conclusions des auteurs de la revue.

En préambule de l'analyse des publications relatives à la toxicologie du E171, le GECU tient à préciser que la grande majorité des études retenues ont été menées avec des échantillons de E171 ou de TiO₂ de qualité alimentaire préalablement dispersés en solution de BSA puis soniqués. Ce protocole, tel que recommandé dans les programmes Nanogenotox¹⁵ et NanoREG¹⁶, a pour ambition d'harmoniser les conditions de préparation des échantillons afin d'obtenir, entre les différents laboratoires, des suspensions théoriquement comparables en termes de distribution en taille des particules. Le GECU estime que l'étape de sonication peut avoir pour effet de redisperser les particules organisées dans les structures d'agrégats ou d'agglomérats ce qui n'est pas totalement représentatif du E171 tel que présent dans les denrées alimentaires. Le GECU estime néanmoins que ces conditions permettent d'identifier certains dangers associés au E171.

3.5.1. Analyse des revues bibliographiques

Deux revues bibliographiques publiées par Winkler *et al.* (2018) et Sohal *et al.* (2018a) se sont intéressées à la toxicité de différentes formes de TiO₂. Ces deux études résument les avancées concernant l'identification du danger du TiO₂ et mettent également en lumière les données manquantes et les incertitudes limitant la mise en place d'une évaluation du risque adaptée aux nanomatériaux. La plupart des études rapportées dans ces deux revues est axée sur les formes nanométriques d'anatase et/ou de rutile du TiO₂, très peu concernent le E171 ou les TiO₂ « de qualité alimentaire ». Le GECU s'est focalisé sur les études pour lesquelles la substance utilisée dans les systèmes d'essai était l'additif alimentaire E171 ou une forme de TiO₂ de qualité alimentaire. Ainsi, l'analyse des études expérimentales *in vivo* par voie orale souligne les points suivants :

- L'absorption systémique très faible mais rapide des particules de TiO₂ de taille supérieure à 100 nm (particules primaires). Kreyling *et al.* (2017) ont montré, à l'aide de particules radiomarquées, que 0,6% (en masse) de particules d'anatase de 70 nm passent la barrière intestinale 1 h après administration et près de 0,05% (en masse) sont internalisées après 7 h. Deux études chez des volontaires réalisées par Pele *et al.* (2015) et Böckmann *et al.* (2000), relatives à l'absorption de capsules de gélatine contenant 50 mg de TiO₂ de qualité alimentaire, ont confirmé, chez l'Homme, une absorption rapide (2 h après ingestion) des particules de TiO₂ (les concentrations sanguines maximales de TiO₂ sont observées 6 h après l'administration par voie orale), l'absence de lésions au niveau de la muqueuse intestinale ayant été parallèlement vérifiée (Pele *et al.* 2015).
- L'absence de toxicité aiguë de particules de TiO₂ de différentes tailles (25, 80 et 155 nm) administrées à dose élevée (5 mg.kg pc⁻¹, un gavage unique en accord avec les lignes directrices 420 de l'OCDE) chez la souris (Wang *et al.* 2007). L'étude de la biodistribution de l'élément titane (Ti) par la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) a montré que l'élément Ti était retrouvé dans tous les organes (foie, rate, reins, poumons, cerveau) quelle que soit la taille des particules. Les teneurs de Ti dans le cerveau étaient significativement plus élevées lors de l'exposition des souris aux particules

¹⁵ https://www.anses.fr/en/system/files/nanogenotox_deliverable_5.pdf

¹⁶ <http://www.nanoreg.eu/>

de TiO₂ de 155 nm par rapport aux nanoparticules de 25 nm. Les teneurs dans la rate étaient équivalentes pour les trois types de particules. Ces résultats indiquent que les particules de Ti peuvent être transportées vers d'autres tissus/organes après leur absorption intestinale.

- La faible toxicité sur la reproduction de différentes formes de TiO₂ pigmentaire (anatase de 153 nm; rutile de 195 et 213 nm) et nanométrique (anatase de 42 nm, rutile de 47 nm et mélange d'anatase (89%) et rutile (11%) de 43 nm) étudiées selon la ligne directrice 414 de l'OCDE. Cependant, l'évaluation ne va pas au-delà du stade fœtal (anomalies structurales et croissance des fœtus) et les déficits fonctionnels qui représentent un aspect important du développement ne sont pas étudiés dans cette ligne directrice. Or, deux études utilisant des formes nanométriques de TiO₂ ont mis en évidence pour l'une, la présence de Ti au niveau de l'hippocampe et une altération des processus de mémorisation chez des rats (Mohammadipour *et al.* 2014, 2016) ; pour l'autre, des changements histologiques de la thyroïde ainsi que des modifications des taux de testostérone chez des rats Sprague Dawley mâles et les femelles traités par voie orale pendant 5 jours avec de l'anatase (20-60 nm) à des doses de 1 et 2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (Tassinari *et al.* 2014).
- L'absence d'études sur le développement, et le neurodéveloppement en particulier, constitue une lacune dans l'évaluation de la toxicité du E171.
- La réponse inflammatoire au niveau intestinal de souris traitées par du TiO₂ (anatase) sous forme microparticulaire de 260 nm (qualité alimentaire) ou nanoparticulaire de 66 nm, administrées en suspension dans l'eau par gavage une fois par jour pendant 10 jours (100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹) ; la réponse se traduit par l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, notamment celles de la voie Th1 et Th17, et par des modifications histologiques de la muqueuse intestinale chez les souris traitées par les nano- et microparticules de TiO₂, modifications non observées chez les témoins. L'hypertrophie et l'hyperplasie sont observées dans les trois régions de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon) lors du traitement par les nanoparticules, tandis que l'iléon est le seul atteint lors du traitement par les microparticules de TiO₂ (Nogueira *et al.* 2012).
- La sensibilité des jeunes rongeurs aux nanoparticules de TiO₂ révélées dans deux études expérimentales et les effets suspectés sur la spermatogenèse.
- La cancérogénicité du TiO₂ considérée négative par voie orale par l'Efsa (2016), sur la base des études de deux ans sur rat et souris (NTP 1979) exposés à de l'Unitane[®] 0-220 ; Winkler *et al.* (2018) relèvent des incertitudes liées à l'absence de caractérisation de l'Unitane[®] et l'analyse des résultats.

En conclusion, les revues de Winkler *et al.* (2018) et de Sohal *et al.* (2018a) soulignent les points suivants:

- L'absorption systémique rapide mais très faible des particules de TiO₂ chez l'animal ainsi qu'une absorption confirmée mais non quantifiée chez l'Homme (volontaire) ;
- L'absence de toxicité aiguë chez les animaux adultes, et d'effet sur la reproduction (fertilité et développement fœtal) ;
- Le manque d'étude sur le développement du TiO₂ de qualité alimentaire, et le neurodéveloppement en particulier, ce qui constitue une lacune dans l'évaluation de la toxicité du E171 ;
- Une réponse inflammatoire au niveau intestinal ;
- La sensibilité suspectée des jeunes animaux ;

- Les études de toxicité aiguë ne mettent pas en évidence d'effets toxiques des nanoparticules de TiO₂, contrairement aux études de toxicité chronique à doses réalistes (basées sur l'apport alimentaire journalier) et à long terme.

Winkler *et al.* (2018) concluent que les lacunes et incertitudes relatives aux études toxicologiques du TiO₂ concernent les points suivants :

- Le potentiel toxique à long terme du TiO₂ compte tenu de la persistance et de l'accumulation tissulaire des particules internalisées (temps de demi vie : 650 jours), même si le taux d'absorption est faible ;
- Les mécanismes de translocation et la réactivité sur la barrière intestinale susceptible de générer une inflammation lymphocytaire.

Winkler *et al.* (2018) et Sohal *et al.* (2018a) recommandent d'évaluer :

- Le potentiel perturbateur endocrinien, les effets chroniques sur différents tissus lymphoïdes (notamment la barrière intestinale, le foie, la rate) et l'absorption systémique ;
- Les effets sur le développement et le neurodéveloppement

et ce, afin d'évaluer les risques sanitaires incluant les composantes populationnelles les plus sensibles.

Pour les membres du GECU, ces recommandations édictées pour le TiO₂ en général, valent *a fortiori* pour le E171 du fait de certaines faiblesses du dossier toxicologique relevées précédemment.

3.5.2. Caractérisation du E171 dans des milieux biologiques ou des simulants alimentaires

Du fait de la grande diversité des lots de E171 présents sur le marché, la caractérisation physico-chimique de cet additif alimentaire est un prérequis indispensable à son évaluation du risque^{17,18}. En plus de la démarche d'identification, la caractérisation physico-chimique du E171 au sein de milieux biologiques ou simulants alimentaires permet d'apporter des éléments à la compréhension de certains mécanismes biologiques (adsorption de biomolécules, diffusion, digestion et absorption des particules, etc.) observés dans des systèmes d'études *in vivo* et *in vitro*.

L'étude de Yusoff *et al.* (2018b) porte sur la comparaison du comportement d'un TiO₂ de qualité alimentaire et du P25 (matériau nanométrique de référence). Les caractéristiques physicochimiques de ces deux matériaux sont étudiées en eau désionisée, en solution de BSA (1 et 20 mg/ml), de sucrose (1 et 100 mg/ml), ou en solution mixte de BSA/sucrose (BSA élevé-sucrose faible ou BSA faible-sucrose élevé). Cet article fait suite à une première étude (Yusoff *et al.*, 2018a), qui démontrait la diminution de la taille des agglomérats de TiO₂ de qualité alimentaire en présence de BSA et sucrose, et la stabilité des corona respectives.

Dans leur seconde étude (Yusoff *et al.* 2018b), les auteurs montrent, en solution, un comportement des nanoparticules de P25 (83% anatase, 17% rutile, taille moyenne de 22 ± 4 nm, surface spécifique de 54 m²/g) différent de celui des particules de E171 (anatase, taille : 60- 360 nm dont 30% (en nombre) de particules < 100 nm, surface spécifique de 8 m²/g) :

- Le P25 s'agglomère significativement plus que le E171 en concentrations élevées de sucrose, et présente alors une charge de surface positive ;

¹⁷ https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES-Ft-Nanogenotox_FinalReport.pdf

¹⁸ <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5327>

- La formation de la corona à la surface des particules du P25, en présence de BSA et de sucrose, est favorisée par rapport aux particules de E171 ;
- Le P25 sédimente plus lentement dans l'eau que le E171 ;
- Le E171 présente, contrairement au P25, systématiquement une charge de surface négative, quel que soit le milieu de dispersion. La présence de sucrose et de BSA augmente la charge négative de surface du E171, cette charge de surface est d'autant plus négative que le ratio sucrose/BSA est élevé.

Cette étude montre la relative stabilité des suspensions du E171, toujours chargées négativement quelle que soit la solution de base, sucrose, BSA ou mélange. La présence de BSA diminue la taille hydrodynamique moyenne des particules de E171 qui passent de 366 nm à une valeur comprise entre 200 et 300 nm. Les auteurs concluent que le P25 ne peut être utilisé comme alternative au E171 dans les essais de toxicité. En effet, le P25, bien qu'étant un matériau homogène utilisé comme référence, ne se comporte pas de manière identique au E171 au sein de simulants alimentaires composés de BSA et de sucrose

Dans la publication de Zhang *et al.* (2019), les auteurs se sont intéressés à l'impact de la matrice alimentaire sur le devenir et la toxicité du E171 au sein du tractus gastro-intestinal. Les auteurs ont élaboré des matrices alimentaires modèles en se basant sur le régime alimentaire américain¹⁹. Ces dernières s'apparentent à une émulsion d'huile dans l'eau et sont notamment constituées de gouttelettes d'huiles susceptibles de s'agréger (phénomène de déplétion). Ce modèle d'aliment, sous forme de liquides ou de poudres, a été caractérisé dans des systèmes *in vitro* mimant les conditions de digestion de la bouche, de l'estomac et de l'intestin. Les auteurs ont notamment démontré que la floculation des gouttelettes d'huiles était favorisée dans les conditions de l'estomac du fait d'un pH plus acide modifiant la charge de surface de ces gouttelettes. Les auteurs se sont par la suite intéressés à la cytotoxicité du E171 sur un modèle de cellules épithéliales de l'intestin (triculture de Caco-2, HT29-MTX, RajiB). Pour cela, le E171 a été dispersé dans un tampon ou un modèle d'aliment puis incubé successivement dans les milieux mimant les conditions de la bouche, de l'estomac et de l'intestin. Enfin, le digestat a été mis en contact avec les cellules épithéliales de l'intestin et la libération de la lactate deshydrogénase (marqueur de l'altération de la membrane plasmique des cellules), a été quantifiée. Les auteurs ont montré que le E171 dispersé dans un modèle d'aliment est moins cytotoxique que le même E171 dispersé dans un tampon et ce quelle que soit la concentration en particules de TiO₂ (0,75 et 1,5% m/m). Pour la plus forte concentration en particules de TiO₂, la cytotoxicité est diminuée d'un facteur 5 lorsque les particules sont dispersées dans le modèle d'aliment. Les auteurs suggèrent que l'adsorption des nutriments à la surface des particules va modifier l'état de charge et l'agrégation des particules de TiO₂ modifiant ainsi leur mobilité au sein du mucus et leur absorption par les cellules épithéliales.

Le GECU souligne que la caractérisation des particules de TiO₂ après dispersion dans les simulants alimentaires puis dans le système d'étude mimant l'intestin aurait pu fournir des indications supplémentaires pour la compréhension des phénomènes d'absorption par les cellules épithéliales.

Dans la publication de Sohal *et al.* (2018b) les auteurs ont étudié la cinétique de dissolution et le comportement d'un TiO₂ (A200 qualifié par le fournisseur comme étant de qualité alimentaire) dans des simulants salivaire, gastrique et intestinal puis dans un modèle mimant la cascade de digestion séquentielle bucco-gastro-intestinal. L'objectif de cette étude était la caractérisation en termes de changement de taille, de distribution en tailles, de morphologie et de modification du pH du milieu digestif.

¹⁹ "What We Eat in America" NHANES 2013–2014

Dans le liquide salivaire simulé, aucun changement significatif dans la distribution granulométrique, la taille des agglomérats, la concentration totale en particules et la concentration en ions n'a été observé pour le TiO₂.

Dans le liquide gastrique simulé, la concentration de particules de TiO₂ situées dans la gamme de tailles 120-140 nm a diminué de 82 %. La taille de l'agglomérat n'a augmenté que légèrement pour le TiO₂ pendant les essais de dissolution mais aucune libération significative d'ions n'a été observée.

Dans le liquide intestinal simulé, l'examen de la distribution granulométrique et des changements de concentration des particules après 8h d'incubation a montré une augmentation de 40 % dans la gamme de tailles 150-250 nm. La concentration totale en nombre de particules a également augmenté de 65% dans le liquide intestinal simulé, mais aucune libération significative d'ions n'a été enregistrée pour le TiO₂.

Concernant la dissolution dans une cascade de digestion physiologiquement pertinente, aucune libération significative d'ions Ti⁴⁺ n'a été enregistrée pour le TiO₂. La taille des agglomérats est passée d'environ 330 nm initialement à environ 600 nm à la fin de la phase gastrique. La taille des agglomérats de particules de TiO₂ de 500 nm a ensuite diminué lors du transfert à la phase intestinale, puis a augmenté (~900 nm) à la fin de cette phase. La dissolution maximale du TiO₂ a été de 0,42 % en début de la phase intestinale. La concentration en nombre de particules et la taille des agglomérats de TiO₂, ainsi que l'adsorption de composants organiques à la surface des particules et les effets corona, entraînent probablement un tel comportement de dissolution, conclusion qui est renforcée par les observations TEM.

En conclusion, le TiO₂ est biodurable²⁰ et persistant dans les conditions de digestion buccale et gastrique. Dans le liquide intestinal, le TiO₂ a été dissous à un maximum de 0,2 % et la taille de l'agglomérat a augmenté de 330 nm à 570 nm (valeur moyenne sur l'ensemble de l'intestin). L'examen de l'ensemble des résultats démontre que le E171 est biodurable dans chacun des liquides digestifs étudiés et lors de la digestion bucco-gastro-intestinale en cascade avec une dissolution maximale du TiO₂ de 0,42 % au début de la phase intestinale.

Dans cette étude, les auteurs ont utilisé un TiO₂ de type anatase référencé sous le code A200. Selon le fournisseur, cette substance présenterait des propriétés semblables au TiO₂ de qualité alimentaire. Cependant, le manque d'informations relatif à l'identification du A200, notamment concernant la distribution en taille ou la surface spécifique ainsi que le manque d'information relatif aux usages de cette substance ne permet pas au GECU d'affirmer qu'elle s'apparente au E171 en termes de caractéristiques physico-chimiques, de comportement et d'effet sur la santé.

- **Conclusions du GECU concernant la caractérisation du E171 dans des milieux biologiques ou des simulants alimentaires**

Le GECU souligne que la caractérisation physico-chimique des lots de E171 est devenue quasi systématique et que les données générées sont de bonne qualité du fait du choix de techniques analytiques adaptées et de la mesure de paramètres pertinents.

Les caractérisations physico-chimiques en milieux complexes ont montré l'influence de simulants alimentaires sur le comportement et le devenir du E171 dans les systèmes d'essai. Ces observations soulignent l'importance de l'étape de préparation des échantillons en préambule des études toxicologiques.

Ces études ont également montré que les nanoparticules modèles de TiO₂ (P25) pouvaient présenter des comportements différents de ceux observés avec le E171 et que leur utilisation

²⁰ Biodurable est la capacité de résister aux altérations chimiques/biochimiques et contribue de façon importante à la biopersistance

comme alternative n'est pas souhaitable dans une démarche de caractérisation du danger de l'additif alimentaire E171.

Les études de Sohal *et al.* (2018b) au sein de systèmes mimant les conditions de digestions bucco-gastro-intestinales montrent que le E171 est biodurable et se dissout très faiblement (jusqu'à 0,42 %). Les conditions physico-chimiques variables tout au long du tractus digestif entraînent des processus d'agglomération dynamiques (augmentation puis diminution de la taille des agglomérats) pouvant expliquer les faibles niveaux d'absorption par voie orale des particules de TiO₂.

Cet élément permet de soutenir l'hypothèse d'une préoccupation toxicologique suite à des expositions aiguës et/ou chroniques au E171 principalement au niveau de l'intégrité de la barrière gastro-intestinale sans pour autant pouvoir écarter des effets adverses sur un plan systémique.

Entre 2017 et mars 2019, trois publications concernant le E171 ont étudié les interactions du TiO₂ avec des souches bactériennes et les impacts d'une exposition au TiO₂ sur la quantité et la qualité du mucus intestinal. Les synthèses de ces publications sont décrites ci-après.

3.5.3. Etudes relatives aux effets du E171 sur le microbiote et la barrière intestinale

Les études rapportées dans cette section n'ont pas été menées sur des microbiotes issus d'animaux mais au sein de systèmes d'essai *in vitro* sur quelques souches bactériennes ne représentant ni l'exhaustivité ni la complexité du microbiote intestinal chez l'Homme.

Les objectifs de l'étude de Radziwill *et al.* (2018) étaient d'étudier les interactions entre des bactéries (provenant de la flore intestinale commensale ou d'origine alimentaire) et le TiO₂ (de qualité alimentaire en comparaison avec un nano-TiO₂ de référence) et d'en évaluer l'impact sur la croissance bactérienne.

Ainsi, cette première étude a été réalisée sur des cultures isolées de huit souches bactériennes appartenant aux espèces *Escherichia coli*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* (subsp. *lactis* et *cremoris*), *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus sakei*. Après ajout de différentes concentrations de TiO₂ allant de 32 à 320 µg/mL dans le milieu de culture avant la croissance bactérienne, la tolérance de chaque souche au TiO₂ a été déterminée en mesurant la durée de la phase de latence (phase *lag*), le taux de croissance spécifique maximal, et l'absorbance finale (mesurée toutes les 15 min pendant 24 h). La viabilité bactérienne a été évaluée par étalement des bactéries exposées au TiO₂ (groupe exposé à 320 µg/mL) et non exposées en comptabilisant le nombre d'unités formant colonies (UFC) après 24 h d'incubation.

La composition élémentaire (les ions enregistrés étaient ¹²C₁₄N, ³²S, ³¹P₁₆O₂, ⁴⁶Ti₁₆O et ⁴⁸Ti₁₆O) de deux bactéries *E. coli* et *L. lactis* exposées au TiO₂ a été cartographiée. Enfin, pour répondre à la question des interactions TiO₂/bactéries et de l'éventuelle toxicité associée, des techniques d'imagerie pour l'étude de l'internalisation du TiO₂ dans deux bactéries modèles (*E. coli* K12 et *L. lactis*) exposées à 320 µg/mL de TiO₂ ont été mises en œuvre.

Les résultats montrent que la croissance bactérienne a été inhibée par le E171 pour toutes les bactéries sélectionnées.

Concernant l'internalisation, l'imagerie par fluorescence DUV (deep ultraviolet) a révélé une co-localisation TiO₂/bactérie qui, dans quelques cas, a entraîné des dommages morphologiques et structuraux chez *E. coli* et *L. lactis*. Une partie de la population bactérienne a interagi fortement avec le E171 et, dans une moindre mesure, avec les nano-TiO₂. Les résultats montrent qu'environ 7 % des bactéries *E. coli* exposées ont internalisé le E171 alors qu'aucune internalisation n'a été observée pour *L. lactis*. Ces résultats semblent corroborer d'autres résultats de toxicité observés chez des bactéries exposées au E171 et montrant que les altérations de la cinétique de croissance et la réduction de la viabilité sont plus importantes pour *E. coli*.

En microscopie électronique à balayage (SEM), un petit nombre de bactéries du genre *L. lactis* exposées au TiO₂ a montré des dommages importants au niveau de la paroi cellulaire avec fuite de composants intracellulaires. Pour *E. coli*, les bactéries traitées avec du E171 sont torsadées et plus rugueuses avec des fissures en surface (cellules plus larges et plus courtes, voire complètement déformées).

En conclusion, des changements morphologiques et ultra-structuraux limités à un faible nombre de cellules bactériennes ont été notés. Des particules de E171 sont étroitement associées à la surface des bactéries, causant une certaine déformation à la zone de contact. Le TiO₂ peut également être partiellement piégé par les bactéries pour induire une toxicité bactérienne modérée, les effets les plus marquants ayant été observé chez *E. coli*.

L'étude *in vitro* de Dufey *et al.* (2017) a utilisé une communauté bactérienne intestinale anaérobie définie, composée de 33 souches bactériennes (MET-1) et exposée pendant 48 h à 37°C à l'obscurité et sous agitation, à 100 et 250 mg/kg de E171, considérées par les auteurs comme des expositions faibles et élevées, équivalentes à celles observées dans l'intestin après ingestion de morceaux de gomme à mâcher ou de bonbons. Le mélange E171/ α -amylase pancréatique porcine a également été étudié afin de modéliser la présence supplémentaire d'une enzyme digestive. Des analyses physiologiques, biochimiques et de l'ADN génomique ont été réalisées suite aux traitements.

Les niveaux de CO₂, de N₂ et les volumes totaux de gaz des cultures traitées se sont révélés similaires aux cultures témoins indiquant l'absence d'influence significative du E171 sur le métabolisme bactérien. En termes d'analyse biochimique, le E171 n'a eu que peu d'impact sur la composition globale en acides gras avec de légères variations dans la composition en acides gras saturés pour les deux concentrations de E171 testées

L'analyse de l'ADN génomique a révélé des schémas similaires entre MET-1 traité et non traité au E171. Aucune différence des distributions phylogénétiques entre les groupes exposés au E171 et les groupes témoins n'a été notée. Lorsque la distribution taxonomique a été normalisée par rapport aux acides gras totaux, il n'y a pas eu d'impact négatif sur la viabilité de MET-1 après les traitements au E171.

L'ajout de E171 a entraîné de légères augmentations des proportions relatives des souches *Acidaminococcus intestini*, *Eubacterium ventriosum* et *Eubacterium rectale*.

En conclusion, l'ajout de concentrations pertinentes de E171 (100 à 250 mg/L) a eu peu d'impact sur la respiration bactérienne, le profil des acides gras et la composition phylogénétique. Ces résultats suggèrent que les particules de TiO₂ de qualité alimentaire n'altèrent pas de façon significative le microbiote intestinal humain.

Talbot *et al.* (2018) ont utilisé des systèmes d'essai *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, des cellules HT29-MTX différenciées (sécrétant du mucus) ont été traitées par du E171 à 40 µg/ml. *In vivo*, des groupes de rats mâles ont été exposés par voie orale pendant 7 jours à 10 mg/kg p.c./jour ou pendant 60 jours aux doses de 0,1 et 10 mg/kg p.c./jour de E171 (et de NM-105). D'après les auteurs de l'étude, ces niveaux de doses sont proches des estimations calculées par l'Efsa (2016) avec, pour le scénario le plus protecteur (*i.e.*, exposition vie entière à des teneurs maximales de

E171), des estimations de l'exposition moyenne variant de 0,4 mg/kg p.c./jour pour les nourrissons et les personnes âgées à 10,4 mg/kg p.c./jour pour les enfants.

L'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser sur des cellules HT29-MTX exposées à du E171 a permis de démontrer la pénétration ainsi qu'une accumulation hétérogène des particules de TiO₂ dans le mucus, sans doute du fait de la quantité non homogène de mucus recouvrant les cellules.

L'analyse du contenu cœcal des rats en fin de traitement court ou subchronique n'a montré que peu ou pas d'impact sur la composition en acides gras à chaîne courte par rapport aux témoins, quel que soit le type de TiO₂. Les auteurs notent également l'absence de modification de l'O-glycosylation des mucines dans l'intestin grêle ou des O-glycanes dans le côlon des rats exposés par voie orale pendant 7 ou 60 jours au TiO₂, quel que soit le type de TiO₂. Ces résultats indiquent que les propriétés cohésives et la fonction protectrice du mucus ne semblent pas altérées.

En conclusion, *in vitro*, les particules de E171 s'accumulent dans le mucus sécrété par les cellules HT29-MTX. *In vivo*, l'exposition au E171 n'a eu que peu ou pas d'impact sur la composition globale en acides gras à chaîne courte du cæcum signifiant probablement l'absence de changements substantiels quantitatifs de mucus. Concernant la qualité du mucus, aucune altération de l'O-glycosylation des mucines de l'intestin grêle ou du côlon distal de rats traités pendant 7 ou 60 jours au E171 n'a été observée par rapport aux animaux non traités, ce qui indique le peu d'impact sur la population à potentiel "mucophile" du microbiote intestinal.

- **Conclusions du GECU relatives aux effets du E171 sur le microbiote et la barrière intestinale**

Les trois publications rapportées dans cette section ont étudié les interactions du TiO₂ sur des souches bactériennes et sur le mucus intestinal.

Sur des cultures bactériennes cultivées et exposées isolément au E171, des changements morphologiques et ultra-structuraux limités à un faible nombre de cellules bactériennes ont été notés. Le TiO₂ peut également être partiellement piégé par les bactéries et induire une toxicité bactérienne modérée. En revanche, l'ajout de concentrations pertinentes de E171 (réflétant des niveaux d'exposition chez l'Homme) a peu d'impact sur la respiration bactérienne, sur le profil des acides gras et sur la composition phylogénétique.

In vitro, sur des cultures de cellules intestinales humaines, les particules de E171 semblent s'accumuler au niveau du mucus sécrété par les cellules. Le rôle de barrière et de facilitation de la translocation (en raison de l'accumulation) de ce mucus n'est pas clairement élucidé.

Chez le rat, l'exposition au E171 n'a que peu ou pas d'impact sur la composition globale en acides gras à chaîne courte du cæcum signifiant probablement l'absence de changements substantiels quantitatifs de mucus. Concernant la qualité du mucus, aucune altération de l'O-glycosylation des mucines de l'intestin grêle ou du côlon distal de rats traités jusqu'à 60 jours au E171 n'a été observée par rapport aux animaux non traités.

En conclusion, il n'existe pas d'indication suffisante permettant de conclure que le E171 altère de façon significative le microbiote intestinal et le mucus intestinal suite à une exposition orale.

3.5.4. Etudes relatives à l'inflammation

Riedle *et al.* (2017) se sont intéressés aux propriétés adjuvantes du TiO₂ et les conséquences sur la sécrétion d'IL-1 β , de TNF- α et les effets pro-inflammatoires. La sécrétion d'IL-1 β peut être déclenchée par des motifs moléculaires associés à des pathogènes tels que les lipopolysaccharides (LPS) et les peptidoglycanes bactériens. Dans cette étude, les auteurs ont considéré l'influence du génotype sur les effets pro-inflammatoires en utilisant des souris

présentant une mutation du gène NOD2. Cette mutation favorise la sécrétion d'IL-1 β et favorise l'inflammation. Ainsi, les auteurs ont isolé des macrophages issus de la moelle osseuse de souris présentant la mutation du gène NOD2 (souris NOD2) et de souris ne présentant pas cette mutation (souris WT). Ces macrophages ont été pré stimulés avec des LPS à une concentration de 10 ng/mL pendant 3h puis exposés à du TiO₂ de qualité alimentaire (taille moyenne de 119 nm avec 40% de particules inférieures à 100 nm) à des concentrations variant de 5 à 100 μ g/mL en présence ou non de muramyl dipeptide (MDP, peptidoglycane de synthèse) ou de peptidoglycane bactérien (PG) à des doses de 0 ou 10 μ g/mL.

Les auteurs ont montré une diminution de la viabilité cellulaire lorsque la concentration en TiO₂ augmente pour les deux génotypes NOD2 et WT. L'ajout de MDP et de PG au TiO₂ augmente très légèrement l'effet par rapport au TiO₂ seul. Les quantités de particules de TiO₂ internalisées par les cellules augmentent de manière dose dépendante pour les deux génotypes NOD2 et WT, la présence de PG ou de MDP n'influe pas sur cette internalisation.

En absence de TiO₂, la sécrétion d'IL-1 β n'est pas déclenchée sur les macrophages préalablement stimulés avec les LPS et en présence de MDP. La sécrétion est très légèrement stimulée en présence de PG. En revanche, la sécrétions d'IL-1 β est stimulée en présence de TiO₂ de façon dose dépendante (entre 5 et 100 μ g/mL). Selon les auteurs, ces résultats confirment que les LPS stimulent la pro-IL-1 β mais ne déclenchent pas l'activation de l'inflammasome, ce dernier, en revanche, est activé par la présence de TiO₂ pour les deux génotypes. Après une coexposition de TiO₂ et de MPD ou de PG, la sécrétion d'IL-1 β est davantage stimulée pour le génotype NOD2. La sécrétion du TNF- α est observée avec la seule étape de préstimulation des macrophages par les LPS, cette sécrétion est d'autant plus prononcée pour le génotype NOD2. La présence de TiO₂, de MDP et de PG stimule d'avantage la sécrétion de TNF- α , cependant aucun effet additif n'est observé entre le TiO₂ et les fragments bactériens.

- **Conclusions du GECU relatives aux études sur l'inflammation**

Les études rapportées par Riedle *et al.* (2017) ont été menées *in vitro* à partir de macrophages issus de moelle osseuse chez la souris. Le protocole mis en place (notamment concernant le prélèvement de macrophages issus de la moelle osseuse) ne permet pas de mimer les conditions qui permettraient de rendre compte des effets potentiels liés à une inflammation locale.

3.5.5. Etudes relatives aux effets génotoxiques

Dans la publication de Jensen *et al.* (2019), les auteurs ont évalué l'effet du E171 (99,8% anatase et 0,2% de rutile) sur l'intégrité de la barrière intestinale *in vivo* et sur les effets génotoxiques.

Après dispersion du E171 en eau stérile additionnée de 2% de sérum de veau foetal, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été mesurée sur des cellules intestinales Caco-2 non différenciées après une exposition de 3 h à des doses de 0,125 à 125 μ g/mL (soit 0,078 à 78 μ g/cm²). Le E171 ne provoque pas la production de ROS dans les cellules Caco-2 après 3 h de traitement. Cependant, les interférences potentielles n'ont pas été évaluées lors de l'essai.

Les auteurs ont par la suite exposé des rats femelles à des doses de 50 et 500 mg/kg pc/j par voie intragastrique (gavage) une fois par semaine pendant 10 semaines. Les rats ont été sacrifiés 24 h après la dernière administration. Les tests des comètes classique et modifié (utilisé pour la détection des lésions oxydantes à l'aide des enzymes de réparation de l'ADN : formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) et human oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1) ont été réalisés à partir d'organes congelés (foie et poumons).

Le test des comètes, normal ou modifié, n'indique aucun dommage à l'ADN dans le foie et le poumon. Cependant, ces études ne disposent pas de témoin positif pour les lésions de l'ADN. Le

témoin positif utilisé dans l'étude ne permet pas de vérifier le bon déroulement de l'essai ni l'activité des enzymes. Les auteurs n'ont pas observé de modification des paramètres hématologiques dans le sérum des rats traités avec le E171. A la dose la plus élevée, le E171 provoque une diminution de l'expression génique d'une protéine des jonctions serrées (TJP1) au niveau du côlon. Ainsi, la translocation de particules ou d'autres composés et les effets systémiques observés pourraient être provoqués par la perte d'intégrité de la barrière intestinale. Aucun effet sur le niveau d'expression d'une autre protéine des jonctions serrées (l'occludine) n'a été observé.

Aucun effet sur la longueur des télomères n'est observé au niveau du foie et de la rate des rats exposés au E171. Une diminution de la longueur des télomères, marqueur de la sénescence cellulaire et de maladies liées au vieillissement comme le cancer, est rapportée dans le poumon avec la plus forte dose de E171. Pour cette étude, la variabilité de réponse est très importante (pourcentage de diminution avec un intervalle de confiance 95% de -0,2 à -34,4%). En exposant *in vitro* des cellules pulmonaires A549 au pool de plasma de rats exposés au E171, une diminution de la longueur des télomères est observée mais uniquement avec la plus faible dose de E171.

Enfin, des cellules THP1 (modèle de monocyte humain) préalablement exposées ou non à un agent (KBrO₃) provoquant des dommages oxydants ont été incubées pendant 30 min aux extraits protéiques provenant du poumon des rats traités oralement avec le E171 avant exposition à la Fpg. La réparation des dommages oxydants de l'ADN provoqués par le KBrO₃ n'est pas affectée par l'extrait de poumon.

Le GECU considère que les doses utilisées dans l'étude *in vivo* (notamment la plus forte) apparaissent comme peu représentatives des données d'exposition potentielle chez l'Homme et sont administrées selon un protocole éloigné (une seule administration toutes les semaines pendant 10 semaines) de celui préconisé dans la ligne directrice OCDE n°489 pour le test des comètes. De plus, les dommages à l'ADN n'ont pas été évalués sur les organes primo-exposés (tractus gastro-intestinal). Par ailleurs, les effets, en particulier les altérations primaires à l'ADN et le stress oxydant, sont mesurés 24h après la dernière administration ce qui permet aux phénomènes de réparation d'avoir lieu. Enfin, les choix effectués pour certains protocoles (absence de témoins positifs, utilisation de pool d'extrait, immunomarquage peu spécifique) et l'expression de certaines données (résultats exprimés en relatif, corrélation faible entre la longueur des télomères et le temps de doublement) ne permettent pas d'évaluer la pertinence des résultats de l'étude.

La publication de Gea *et al.* (2019) a investigué les effets cytotoxiques et génotoxiques *in vitro* de différentes formes de nanoparticules de TiO₂, du P25 et de particules de TiO₂ de qualité alimentaire (anatase avec une taille moyenne de 150 ± 50 nm) sur des cellules pulmonaires humaines (BEAS-2B). Les particules ont été dispersées dans de l'eau contenant 1% de DMSO (diméthylsulfoxyde) avant homogénéisation par ultra-sonication. Les concentrations utilisées varient de 5 à 80 µg/ml (soit 1,3 à 20,7 µg/cm²) pour les mesures de cytotoxicité et de 20 à 160 µg/ml (soit 5,2 à 41,6 µg/cm²) pour les études de génotoxicité. Les effets cytotoxiques ont été évalués suite aux mesures de l'activité mitochondriale et de l'altération de la membrane plasmique des cellules. Les effets génotoxiques ont été déterminés en mesurant les dommages à l'ADN via deux tests des comètes, le premier (alkaline Comet assay) permet de déterminer les dommages directs à l'ADN, le second (Fpg-modified Comet assay), suit le même protocole mais en présence d'enzyme de réparation de l'ADN (Fpg) et permet de déterminer à la fois les dommages directs et indirects à l'ADN.

Concernant les études de cytotoxicité, les auteurs rapportent que le P25 entraîne une faible diminution de la viabilité cellulaire à partir de 50 µg/mL en présence de lumière. Cette diminution de la viabilité cellulaire est moins marquée en absence de lumière et apparaît à partir de 80 µg/mL. Aucun effet cytotoxique n'est observé pour les autres formes de TiO₂ à la plus forte dose testée de 80 µg/mL après 24h d'exposition en présence ou en absence de lumière.

Concernant les effets génotoxiques en présence de lumière, les auteurs observent que le P25 n'est pas génotoxique en absence de Fpg mais présente des dommages à l'ADN dose-dépendants en présence de Fpg. Les dommages oxydants à l'ADN sont observés à partir de 50 µg/mL pour le P25. Dans le cas du TiO₂ de qualité alimentaire, des dommages à l'ADN dose-dépendants (à partir de 50 µg/mL) sont observés en présence ou en absence d'enzyme Fpg, les dommages oxydants étant significativement plus importants que les dommages directs. En absence de lumière, les effets génotoxiques du P25 sont toujours observés uniquement en présence de Fpg mais avec une intensité plus faible par rapport aux conditions sous lumière. Pour le TiO₂ de qualité alimentaire, en absence de lumière, les effets génotoxiques sont observés avec ou sans Fpg, et les dommages oxydants sont observés à partir de la concentration la plus forte (160 µg/mL). Enfin, de l'imagerie en spectroscopie Raman montre la présence de particules de TiO₂ (P25 et TiO₂ de qualité alimentaire) au sein des cellules pulmonaires.

Le GECU relève plusieurs limitations dans cette étude : le manque d'information concernant la caractérisation physico-chimique du TiO₂ de qualité alimentaire, les choix méthodologiques discutables pour les protocoles de génotoxicité et de cytotoxicité (présence de DMSO pouvant affecter la réponse oxydante, durée d'exposition de 24h permettant la mise en place de mécanismes de réparation, conditions de traitement différentes entre les études de cytotoxicité et de génotoxicité, interférences (réponses des tests qui pourraient être affectées par la présence des particules) non investiguées, choix des cellules étudiées, absence de données sur la cytotoxicité aux plus hautes doses testées lors des études de génotoxicité).

Dans l'étude de Dorier *et al.* (2018) les auteurs ont étudié les effets du E171 (particules primaires de 118 ± 53 nm) et de deux formes nanoparticulaires de TiO₂: NM-105 (23 nm) et A12 (12 nm) sur des cellules intestinales humaines (Caco-2 et HT29 MTX non différenciées) en condition *in vitro*. Ainsi, la cytotoxicité, les dommages à l'ADN, le stress oxydant et le stress du réticulum endoplasmique ont été étudiés.

Les particules de TiO₂ ont été soniquées dans de l'eau stérile ultrapure immédiatement avant exposition des cellules. Les valeurs du diamètre hydrodynamique et de l'index de polydispersité du E171 ont été publiées dans un article précédent. Après dilution dans du milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal, les auteurs indiquent une augmentation du diamètre hydrodynamique des particules de E171 de 415 ± 69 nm à 739 ± 355 nm ainsi qu'une augmentation de la polydispersité des particules. Après dispersion des particules, les cellules ont été exposées à des doses de 20, 50, 100 et 200 µg/mL pour les trois formes de particules testées. Les auteurs n'observent aucun effet cytotoxique après 6 et 48h d'exposition au E171 et au NM-105 (les résultats obtenus avec A12 n'étant pas présentés) jusqu'à des doses de 200 µg/mL.

Toutes les formes de TiO₂ entraînent une augmentation de la production de ROS quel que soit le temps d'exposition (entre 6 et 48h) avec une augmentation dose-dépendante dans le cas du E171. L'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans des mécanismes de défense antioxydant a été mesurée. Seule l'expression des gènes de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase 1 est diminuée après 48h d'exposition au E171 à 50 µg/ml. Les auteurs n'observent aucun dommage à l'ADN, ni aucune augmentation du niveau de la guanine oxydée, ni aucun effet sur le niveau des foyers de 53BP1 (marqueur des cassures double brins), ni aucune modification de l'expression de certains gènes de réparation et de gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique. Les auteurs concluent que le E171 ne provoque que des effets mineurs sur l'épithélium intestinal.

Les résultats de cette étude confirment d'autres résultats obtenus à partir d'une étude similaire et menée par la même équipe (Dorier *et al.* 2017). Dans cette publication, les auteurs ont également montré que le E171 était modérément toxique sur les mêmes types cellulaires Caco-2 et HT29 MTX. Les effets génotoxiques (dommages à l'ADN *via* stress oxydant) du E171 sur ces modèles cellulaires étaient plus prononcés après une exposition répétée (3 fois par semaine pendant 3 semaines) du E171 par rapport aux cellules exposées pendant 6, 24 ou 48h.

Le GECU relève plusieurs limitations dans cette étude : les concentrations sont exprimées en µg/ml et non en µg/cm² et les conditions de traitement (surface des puits, volume) ne sont pas

clairement établies (excepté pour les essais de viabilité et le test des comètes) ce qui ne facilite pas la conversion d'une unité à une autre. De plus, au vu de ces incertitudes, les concentrations testées ne semblent pas similaires sur l'ensemble des paramètres étudiés. Aucune donnée de stabilité des particules de TiO₂ au cours du temps dans le milieu n'est fournie. Enfin, l'utilisation de co-culture de Caco-2 et HT29-MTX non différenciées limite la conclusion vis-à-vis de l'effet sur l'épithélium intestinal.

Dans la publication de Proquin *et al.* (2017) les auteurs ont recherché les effets cytotoxiques et génotoxiques *in vitro* du E171 (constitué à 39 % de nanoparticules) sur des cellules intestinales humaines (Caco-2 ou HCT116) et les ont comparés à ceux observés pour des nanoparticules (taille variant de 10 à 30 nm) et des microparticules (taille moyenne de 535 nm) de TiO₂.

Le E171 ainsi que les nano et microparticules de TiO₂ ont été dispersés dans 0,05% de sérum albumine bovine par sonication pendant 30 min. Dans le cas de l'étude des dommages aux chromosomes, mis en évidence par un test du micronoyau, le E171 a été dispersé dans un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal afin d'éviter l'apparition de faux positifs.

Pour l'étude de cytotoxicité, les cellules Caco-2 ont été exposées aux trois formes de TiO₂ à des concentrations variant de 0,001 à 1 mg/mL (soit 0,143 à 143 µg/cm²) pendant 24 h. Pour les cellules HCT116, seul le E171 a été testé à des concentrations variant de 0 à 1 mg/mL (soit 100 µg/cm²). Le E171 engendre un effet cytotoxique sur les cellules Caco-2 à des concentrations de 14,3 µg/cm² (0,1 mg/mL) et 143 µg/cm² entraînant respectivement une diminution de 27 et 73 % de la viabilité des cellules après 24 h d'exposition. Les nanoparticules et microparticules de TiO₂ engendrent un effet cytotoxique sur les cellules de Caco-2 à la dose maximale de 143 µg/cm² entraînant respectivement une diminution de 33 et 48% de la viabilité des cellules. Dans le cas des cellules HCT116, aucun signe de cytotoxicité n'est observé jusqu'à la dose maximale de 100 µg/cm².

Les auteurs se sont par la suite intéressés à la génération de ROS dans un système acellulaire et cellulaire (sur cellules Caco-2) en absence ou en présence d'H₂O₂ (permet de mimer un environnement inflammatoire). Dans le système acellulaire, en présence de BSA, aucune formation de ROS n'est observée avec les trois formes de TiO₂ pour des concentrations variant de 0,143 à 143 µg/cm² en particule de TiO₂. Les auteurs expliquent ces résultats par la présence de la corona protéique qui serait susceptible d'inhiber cette production. Dans ce même système, en absence de BSA, des ROS sont générés en présence de E171 et de nanoparticules de TiO₂, les quantités de ROS produites ne sont pas statistiquement significatives avec ou sans H₂O₂. Dans le système cellulaire, en absence de BSA, le E171 et les nanoparticules de TiO₂ ne produisent pas de ROS jusqu'à la dose maximale testée de 1,43 µg/cm² avec ou sans H₂O₂, seules les microparticules génèrent des ROS dès la plus faible concentration testée de 0,14 µg/cm² en présence d'H₂O₂.

Les dommages primaires à l'ADN ont été évalués par un test des comètes sur des cellules Caco-2 avec les trois formes de TiO₂ à la concentration de 0,14 µg/cm² (et jusqu'à 1,43 µg/cm² pour les nanoparticules) avec ou sans azoxyméthane (AOM, agent génotoxique). Le E171, les nano et les microparticules induisent des cassures de l'ADN dans les cellules Caco-2 avec ou sans co-traitement avec l'AOM.

Les aberrations chromosomiques ont été évaluées avec un test du micronoyau, les cellules HCT116 ont été exposées au E171 à des concentrations variant de 0 à 100 µg/cm². Le E171 provoque une augmentation des micronoyaux dans les cellules HCT116 à partir de 5 µg/cm². Les auteurs observent également que le E171 semble interagir avec la région centromérique des pôles des kinétochores pendant la mitose et suggèrent que le E171 est attaché à l'ADN des cellules en mitose.

Le GECU relève plusieurs limitations dans cette étude. La stabilité des particules au cours du temps et l'impact des différents milieux utilisés sur cette stabilité ne sont pas indiqués. Aucune indication n'est fournie quant au traitement des contrôles en termes de sonication.

Concernant le test du micronoyau, certaines recommandations de la ligne directrice OCDE n°487 ne sont pas suivies (choix de la lignée cellulaire, mesure de cytotoxicité en présence de

cytochalasine B), très peu de cellules binucléées sont observées sur les photos ce qui suggère un problème de réalisation du test du micronoyau sur les cellules HCT116 et aucune donnée brute n'est présentée. De plus, les photos des kinétochores proposées dans la publication sont peu probantes.

Enfin, l'ensemble des résultats n'est pas obtenu sur la même lignée cellulaire (micronoyau seulement sur cellules HCT116 et le reste des études sur cellules Caco-2);

Le GECU rappelle que, dans l'évaluation de l'Efsa (2018), certaines de ces limites avaient déjà été rapportées.

- **Conclusion du GECU sur la génotoxicité :**

De nombreux travaux ont portés sur les effets génotoxiques des particules de TiO₂. Dans la revue de Charles *et al.* (2018), les auteurs ont analysé 36 publications intégrant des données de génotoxicité *in vitro*. Un effet génotoxique est rapporté dans 60% des études (parmi lesquelles une seule étude menée avec du E171 a été retenue et indique un effet génotoxique *in vitro*) mais sans qu'un type de TiO₂ (cristallinité, taille, coating) puisse être associé à une réponse spécifique. La majorité des publications analysées dans cette revue montrent que l'effet génotoxique est provoqué par un mécanisme secondaire *via* le stress oxydant.

Les nouvelles études analysées par le GECU ne remettent pas en cause les conclusions de Charles *et al.* (2018). La génération de stress oxydant *in vitro* semble être l'un des mécanismes par lequel le TiO₂ de qualité alimentaire provoque des dommages à l'ADN. Une seule étude *in vivo* réalisée avec du E171 a été identifiée depuis 2017. Bien que le GECU note une absence d'activité génotoxique et de génération de stress oxydant, le protocole d'étude mis en place pour cette étude n'apparaît pas pertinent.

Bien qu'il n'y ait pas d'études montrant une interaction directe des particules de TiO₂ avec l'ADN et/ou l'appareil mitotique, l'effet direct du TiO₂ sur le matériel génétique ou d'autres molécules interagissant avec le matériel génétique ne peut pas être exclu.

3.5.6. Etudes relatives aux effets cancérogènes

Les trois publications de Proquin *et al.* (2018 a, b, c) ont été rédigées à partir des résultats issus d'une étude *in vivo* qui s'est intéressée à l'analyse transcriptomique du côlon distal de souris après administration répétée de E171 avec ou sans co-traitement avec de l'azoxyméthane (AOM) et du dextran sodium sulfate (DSS) afin de mimer une étape d'initiation (effet génotoxique de l'AOM) couplée à une irritation (effet du DSS). Elle fait suite à une autre étude menée par la même équipe (Urrutia-Ortega *et al.* 2016) qui concluait à l'augmentation du nombre de tumeurs observées au niveau du côlon distal de souris exposées au E171 par ingestion pendant dix semaines et préalablement traitées avec de l'AOM et du DSS. Les études menées par Proquin *et al.* visaient à déterminer les changements moléculaires associés à l'augmentation du nombre de tumeurs, cependant le traitement a été raccourci à trois semaines car des changements physiologiques avaient déjà été observés après quatre semaines de traitement dans l'étude précédente (Urrutia-Ortega *et al.* 2016).

Dans un premier temps, le E171 (5 mg/kg pc/j, constitué à 39% (en nombre) de nanoparticules) a été administré par gavage à des souris cinq fois par semaine pendant 3 semaines. Quatre animaux soit deux mâles et deux femelles dans chaque groupe (contrôle et traité) ont été sacrifiés après 2, 7, 14 et 21 jours.

Suite au traitement avec le E171, des modifications géniques ont été observées sur 417, 971, 1512 et 229 gènes après respectivement 2, 7, 14 et 21 jours. Parmi ces modifications géniques, seulement 32 gènes dérégulés dont 23 ont des fonctions biologiques connues sont communs pour trois des quatre durées de traitement. Les modulations observées sont plus marquées après 7 et 14 jours. Après deux jours de traitement, trois groupes de processus sont principalement affectés i) la signalisation (avec essentiellement des gènes impliqués dans l'olfaction ainsi que des récepteurs couplés aux protéines G) ii) la réponse immune et iii) la signalisation du cancer. Après 7 jours de traitement, la signalisation cellulaire est largement affectée et présente un nombre de gènes dérégulés bien plus nombreux qu'après 2 jours. La signalisation du cancer est également touchée et plusieurs groupes nouveaux apparaissent i) cycle cellulaire, ii) stress oxydant, iii) réponse neuronale et iv) métabolisme.

En utilisant une autre approche, le processing des ARNm et le transport membranaire de petites molécules apparaissent également comme des processus qui sont affectés. Après 2 et 7 jours la signalisation (récepteurs de l'olfaction et couplés aux protéines G) n'est pas affectée mais après 14 jours, la signalisation du cancer est modulée au travers de plusieurs voies potentielles. Des effets sont également observés sur la réponse immune et le cycle cellulaire. Enfin, des modulations touchant un nombre de gènes plus restreints sont notées vis-à-vis du stress oxydant, du développement osseux et de la réponse neuronale. La seconde approche utilisée pour l'analyse indique des effets sur le métabolisme en particulier le métabolisme des protéines et le métabolisme de certaines pathologies. Après 21 jours, seulement 3 groupes de processus sont affectés : i) la signalisation de l'olfaction et des protéines G comme à 2 et 7 jours, ii) le stress oxydant et iii) le métabolisme. Cependant, il faut noter que pour les deux derniers processus, les modulations et le nombre de gènes impliqués restent faibles.

Les auteurs concluent que le E171 agit sur le côlon par différents mécanismes (réponse immune, inflammation, récepteurs olfactifs et aux protéines G, cycle cellulaire, réparation de l'ADN, métabolisme, récepteurs à la sérotonine, gènes liés au cancer). Certains de ces mécanismes pourraient expliquer comment le E171 pourrait agir sur le développement de cancer colorectal.

Dans la publication de Proquin *et al.* (2018c), les auteurs ont voulu tester l'hypothèse que le E171, après ingestion, pouvait provoquer : des changements d'expression génique associés à l'inflammation, le dérèglement des gènes associés au cancer et la perturbation du système immunitaire avant l'apparition de tumeurs détectables. Les auteurs ont suivi le schéma expérimental précédent mais avec un traitement incluant une seule administration d'AOM à 12,5 mg/kg en injection intrapéritonéale une semaine avant l'expérience ainsi qu'une administration de 2% de DSS *via* l'eau de boisson pendant les cinq premiers jours de l'expérience.

Le nombre de gènes modulés après une exposition au E171 précédée d'un traitement à l'AOM et au DSS est bien plus important qu'avec le E171 seul : 411 gènes après 2 jours, 3506 gènes après 7 jours, 2553 gènes après 14 jours et 1178 gènes après 21 jours. Très peu de gènes (seulement 27 dont 8 n'ont pas de fonction connue) sont communs sur trois des quatre durées de traitement. Après 2 jours, une seule fonction biologique est modulée, celle de la signalisation par olfaction et par protéines G. Les niveaux de modulation sont relativement importants et beaucoup plus élevés que ceux observés lors du traitement au E171 seul. De manière globale, des dérégulations des niveaux d'expression sont observées après 7 jours pour les gènes impliqués dans le transport de molécules, le métabolisme, la signalisation, le métabolisme des xénobiotiques, la matrice extracellulaire et la réponse immune. Après 14 jours, 40 voies différentes de 8 fonctions biologiques sont modifiées. Les gènes impliqués dans le développement du cancer du côlon et sa signalisation, modulés après 14 jours, sont des gènes du métabolisme des xénobiotiques. La réponse neuronale et le transport des molécules sont aussi des processus affectés par le traitement. 21 jours après le début du traitement, aucune modification des gènes associés au métabolisme et au métabolisme des xénobiotiques n'est détectée. Les voies modifiées sont la transduction du signal, la réponse immune, l'organisation de la matrice extracellulaire et la réponse neuronale avec majoritairement des diminutions d'expression.

Pour les quatre durées de traitement, des modulations d'expression ont été observées concernant la signalisation et le système immunitaire. A partir de 7 jours et jusqu'à 21 jours après le début du traitement, la matrice extracellulaire et la réponse neuronale sont modulées. A 7 et 14 jours, des effets particulièrement marqués sont observés sur la signalisation, le métabolisme, le système neuronal et le métabolisme des xénobiotiques.

En comparant les résultats des trois publications, il apparaît que des processus communs sont altérés par le E171 avec ou sans traitement préalable avec l'AOM et le DSS telles que la signalisation par les récepteurs olfactifs et les protéines G ainsi que la réponse immune et neuronale. Cependant, certains processus ne sont affectés qu'en présence d'AOM et de DSS tels que le métabolisme des xénobiotiques, le transport de molécules, l'hémostase et l'organisation de la matrice extracellulaire.

Les auteurs concluent que le E171 affecte des mécanismes biologiques qui peuvent faciliter le développement de cancer et que ceux-ci sont promus avec le traitement AOM/DSS.

- **Conclusions du GECU relatives aux études de cancérogénicité**

Le GECU tient à préciser que les études de cancérogenèse (NTP 1979), retenues par l'Efsa lors de l'évaluation du E171, ont été réalisées sans aucune caractérisation préalable de l'Unitane® (anatase, distribution en taille non spécifiées) supposé être de qualité alimentaire. Dans son avis de 2016, l'Efsa conclut que le E171 n'est pas cancérogène en se basant sur des résultats d'études obtenus avec de l'Unitane®. Cependant, aucune information ne nous permet de garantir les similitudes en termes de caractérisation physico-chimique entre l'Unitane® et le E171. Les effets potentiels de type promoteurs de tumeurs du E171 mis en évidence expérimentalement par Urrutia-Ortega *et al.* (2016) et Bettini *et al.* (2017) doivent être confirmés par la mise en place de nouvelles études intégrant notamment l'utilisation de plusieurs biomarqueurs (voir les recommandations du GECU en partie 3.7).

Dans les travaux menés par Proquin *et al.* (2018, a, b, c), les auteurs concluent que le E171 affecte des mécanismes biologiques qui peuvent faciliter le développement de cancer et que ceux-ci sont promus avec le traitement AOM/DSS. De plus, le GECU note que le niveau d'expression des histones après 7 jours de traitement pourrait être à la base de modifications épigénétiques. Le GECU relève également que les réponses souvent peu marquées avec le E171 seul pourraient être liées au protocole de l'étude qui n'a été menée que sur 3 semaines de traitement avec des côlons prélevés 2 à 3 jours après la dernière administration (sauf dans le cas des deux premiers jours de traitement) ; le choix de cette durée n'est pas soutenu par les résultats présentés dans l'étude d'Urrutia-Ortega *et al.* (2016). De plus, 2 rats par sexe ont été analysés par durée de traitement ce qui pourrait augmenter la variabilité des résultats par rapport à l'utilisation d'un seul sexe, l'étude d'Urrutia-Ortega *et al.* (2016) ayant été réalisée sur des souris mâles uniquement. Enfin, les conclusions relatives à l'augmentation de la prolifération sont peu convaincantes du fait de la qualité des immunomarquages sur coupes.

Les éléments rapportés dans les études de Proquin *et al.* (2018 a,b,c) corroborent les questionnements du E171 soulevés par l'Anses (Anses, 2017) lors de son analyse de l'étude de Bettini *et al.* (2017), notamment autour des effets promoteurs.

3.5.7. Etudes relatives aux anomalies du développement

L'étude de Jovanovic *et al.* (2018) a été réalisée sur vingt générations de drosophiles et rapporte des mesures, après exposition au E171, de la viabilité de la descendance (de l'œuf à l'adulte) à

chacune des générations, de la fécondité, du développement, de la morphologie, de l'accumulation de l'élément Ti, de la génotoxicité au 3^{ème} stade larvaire à la génération F1, F10 et F20 et de la teneur en granules protéiques des trophocytes (cellules nourricières).

Cette étude fait suite à une étude préliminaire (Jovanovic *et al.* 2016) menée chez la drosophile, *D. melanogaster*, sur une génération qui soulignait une augmentation de la durée de la nymphose, une sous-expression des gènes impliqués dans le stress oxydatif et l'apparition de phénotypes aberrants suite à l'exposition au E171.

La concentration de E171 dans le milieu nutritif des drosophiles correspond, d'après les auteurs, à une exposition humaine par voie orale de 20 mg/kg pc/j. L'étude multigénérationnelle indique que l'exposition au E171 altère significativement la dynamique du développement et de la reproduction de la drosophile, réduit la fécondité et augmente la génotoxicité. L'apparition de phénotypes aberrants (< 0,1%) se traduisant par des anomalies morphologiques (aile manquante, thorax déformé) observée exclusivement chez les insectes exposés au E171, mérite d'être relevée. Ces aberrations phénotypiques ne sont pas transmises à la descendance (vérifié par croisement sur les cinq générations suivantes) et résulteraient d'anomalies du développement.

Dans l'étude de Savic *et al.* (2018) les auteurs étudient les effets d'un milieu sédimentaire contaminé par le E171 sur le cycle de vie du chironome (ou ver de vase) et son développement. Le chironome est un insecte diptère dont le cycle larvaire s'effectue dans le sédiment avant émergence. Les résultats montrent qu'une contamination du sédiment par du E171 à des concentrations supérieures à 1 000 mg/kg de sédiment sableux est toxique pour les chironomes (augmentation du taux de mortalité et diminution du taux d'émergence vérifié). Le stress induit par TiO₂ à faibles concentrations (2,5, 25 et 250 mg TiO₂/kg sédiment) qui sont sans effet sur la viabilité, se traduit par des modifications morphométriques de la capsule céphalique et des ailes (variations significatives de la taille du mentum (élongation, forme et présence des dents), des mandibules et des ailes) et par des malformations.

Dans l'étude de Ma *et al.* (2019), les auteurs ont comparé les effets toxicologiques d'un TiO₂ non nanométrique (non qualité alimentaire), d'un TiO₂ de qualité alimentaire et du P25 chez le nématode, organisme modèle largement utilisé en biologie. La phototoxicité a été mesurée après 24h d'exposition, dont 3h sous UV, chez le nématode à des doses variant de 1 à 10 mg/L pour les trois formes de TiO₂. Les résultats indiquent que le P25 est la forme la plus phototoxique alors que le TiO₂ non nanométrique est la forme la moins phototoxique. En l'absence d'UV, les auteurs observent une diminution de la longévité des nématodes pour les trois formes de TiO₂, cette diminution étant plus importante pour le P25 avec une diminution de la longévité pouvant atteindre 27%.

Les auteurs montrent également que les trois formes de TiO₂ entraînent, à des niveaux comparables, une diminution dose-dépendante de la reproduction et de la longévité du nombre de progéniture dans la gamme des doses testées (1 à 10 mg/L). Enfin, les résultats indiquent des malformations vulvaires suite à l'exposition des nématodes aux trois formes de TiO₂, les effets les plus importants étant observés avec le P25.

- **Conclusions du GECU relatives aux études sur le développement**

Les travaux expertisés dans cette section ne peuvent pas être considérés dans un contexte d'évaluation du risque pour l'Homme du fait des systèmes d'étude utilisés et de la difficulté de transposer les doses employées (études de Ma *et al.* (2019) et Savic *et al.* (2018)) à des niveaux d'exposition par ingestion chez l'Homme. Cependant, ces travaux permettent de mettre en lumière certaines alertes relatives aux anomalies du développement.

Jovanovic *et al.* (2018) ont réalisé une étude multigénérationnelle sur la drosophile, modèle d'étude des mécanismes de différenciation. Le fait marquant de cette étude sur la drosophile est

l'apparition d'anomalies du développement (d'origine non génétique) suite à l'ingestion du E171 à des doses représentatives de l'exposition humaine. L'étude de Savic *et al.* (2018) sur les stades larvaires et l'émergence du chironome va dans le même sens que celle de Jovanovic *et al.* (2018) sur la drosophile, à savoir l'apparition d'anomalies du développement induite par l'exposition au E171.

3.5.8. Etudes relatives aux effets du E171 sur le système cardiovasculaire

Dans l'étude de Jensen *et al.* (2018a), les auteurs ont exploré les effets cardiovasculaires du E171 sur des modèles *ex vivo* (segments aortiques) et *in vivo* (rats, 1 gavage par semaine pendant 10 semaines, à des doses d'exposition de 50 et 500 mg/kg p.c.). L'étude montre que l'exposition par voie orale au E171 entraîne une altération de la réponse vasomotrice des artères coronaires, sans évidence de stress oxydatif. Le E171 (à des doses de 500 mg/kg) augmente la vasorelaxation induite par l'acétylcholine et la vasoconstriction induite par la 5HT (5 hydroxytryptamine ou sérotonine).

Les mêmes réponses ont été obtenues *ex vivo* après exposition directe des segments aortiques. Aucune différence significative des paramètres sanguins marqueurs d'un stress oxydatif (ascorbate, malondialdéhyde, tétra hydrobioptérine marqueur de l'activation de la voie eNOS et diméthylarginine) n'a été observée entre les groupes témoins et traités.

Les mêmes auteurs (Jensen *et al.* 2018b) ont vérifié ces résultats *ex vivo* en utilisant des segments d'artères sous cutanées humaines (obtenues à partir de prélèvements chirurgicaux de tissus au niveau de la ceinture abdominale) exposé à du E171 à des doses de 14 et 140 µg/ml. La concentration de 140 µg/ml correspond, sur la base de l'évaluation de l'Efsa, à la dose moyenne maximale journalière de 10,4 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ chez l'enfant, et celle de 14 µg/ml au dixième de cette dose. L'exposition *ex vivo* de 30 minutes et 18h (à 14 et 140 µg/ml) augmente la vasoconstriction artérielle, tandis que la vasorelaxation n'est pas significativement altérée après 18h. L'expression génique des cellules endothéliales (récepteurs 5HT, 5HT2A; ICAM-1 et VCAM, intercellular and vascular cell adhesion molecule) est inchangée.

Les objectifs de l'étude de Freyre *et al.* (2018) étaient d'étudier l'influence de la forme de différentes particules de TiO₂ (le E171 et deux nano-TiO₂ anatase) mais aussi du milieu de dispersion (sérum bovin fœtal (FBS) et solution saline (SS)) sur la réponse observée au niveau du réseau de microvaisseaux, de la modulation de gènes liés à l'angiogenèse et de l'ossification du fémur, chez un modèle embryonnaire de poule Leghorn (*Gallus gallus domesticus* L.). Ainsi, 7 jours après fertilisation, une injection unique de 10 µg/œuf a été réalisée *via* le flux sanguin de la membrane chorioallantoïque (MCA) pour chacune des suspensions de TiO₂. Après une période de recouvrement de 7 jours après exposition, les MCA et les fémurs des embryons ont été récupérés afin de déterminer l'impact d'une exposition au TiO₂ sur le réseau de micro-vaisseaux (sur la MCA), sur l'expression de gènes liés à l'angiogenèse et sur l'ossification du fémur (longueur et largeur).

Les auteurs observent qu'en fonction du milieu utilisé pour suspendre le E171, des différences significatives en termes de taille hydrodynamique (mesurée par diffusion dynamique de la lumière) et de potentiel zéta ont été notées avec des valeurs de 90,57 ± 4,6 nm / -21,1 ± 0,5mV et de 695,5 ± 141,6 nm / -38,36 ± 1,57mV, respectivement, dans le FBS et le SS.

Les mesures de la densité microvasculaire de la MCA ont montré que les trois formes de TiO₂ induisent une diminution de la longueur moyenne des branches (- 8,8 µm pour le E171) lorsque les TiO₂ sont dispersés dans le SS mais aucun effet n'a été observé dans le cas du FBS. En revanche, la moyenne de la longueur maximale des branches n'a pas été modifiée quels que soient les types de TiO₂ et de milieu utilisé. Aucune différence de l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'angiogenèse n'a été observée après les traitements avec les TiO₂ (seul un

effet général important a été observé lorsque le FBS ou le SS est utilisé pour disperser les nanoparticules).

Concernant l'ossification, les fémurs des œufs exposés au FBS seul ont montré des altérations dans la minéralisation, ces altérations ont également été observées dans les fémurs des œufs exposés aux différents TiO₂ testés. Aucun des TiO₂ dispersés dans le SS n'a induit d'altérations de l'ossification fémorale.

Alors qu'il n'existe pas de consensus sur le choix du milieu de dispersion à utiliser pour les études toxicologiques des nanoparticules et pour l'injection intraveineuse pour les modèles *in vivo*, le GECU estime que cette étude démontre principalement l'importance du milieu utilisé pour la dispersion des nanoparticules qui diffère sur la forme physique et modifie l'interface bio-nano. Concernant le E171, le seul effet est observé au niveau de la densité microvasculaire de la MCA lorsqu'il est dispersé dans le SS. Aucune différence de l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'angiogenèse n'a été observée après les traitements avec les différents TiO₂. Enfin, aucune altération de l'ossification fémorale spécifique au TiO₂ n'a été notée.

- **Conclusions du GECU sur les études relatives aux effets du E171 sur le système cardiovasculaire**

En résumé, les effets vasculaires mis en évidence dans la première étude (Jensen *et al.* 2018a) sont significatifs mais restent faibles compte tenu du niveau d'exposition élevé.

Les auteurs concluent que l'exposition au E171 peut entraîner une augmentation du tonus artériel, de la tension artérielle et être facteur d'hypertension et d'insuffisance cardiaque.

Le GECU remarque que ces résultats corroborent l'altération de la microcirculation vasculaire et les effets cardiaques rapportés chez les rongeurs après inhalation de nanoparticules de TiO₂ (Nurkiewicz *et al.* 2008; Kan *et al.* 2012 et 2014) ou après administration intratrachéale (Savi *et al.* 2014).

3.6. Conclusions et recommandations du GECU

Depuis l'avis de l'Anses (avis 2017-SA-0020) concernant la toxicité du E171 par voie orale, plusieurs études relatives à l'identification du danger du E171 ont mis en lumière, malgré certaines limitations méthodologiques, de nouveaux signaux (modification de la régulation des histones ou effets sur le développement) ou encore ont rapporté certains effets déjà publiés (par exemple, les effets génotoxiques observés *in vitro* et médiés par le stress oxydant).

Les études de caractérisations physico-chimiques dans des simulants alimentaires et biologiques montrent que le TiO₂ est biodurable au sein du tractus bucco-gastro-intestinal et que la formation de la corona, due à l'adsorption de composants de la matrice alimentaire, modifie les propriétés de surface des particules de TiO₂ et peut influencer leur devenir *in vivo*.

Concernant les études relatives aux interactions entre les particules de TiO₂ et certaines souches bactériennes *in vitro*, aucune indication ne permet de conclure que le E171 peut altérer de façon significative le microbiote intestinal suite à une exposition par voie orale. Le GECU tient à préciser que les études rapportées dans cet avis ont été menées exclusivement *in vitro*, ce qui ne rend pas compte de la complexité ni de l'exhaustivité du microbiote intestinal. *In vivo*, l'exposition au E171 n'induit probablement pas de modification substantielle qualitative ou quantitative du mucus.

Des études menées chez la drosophile ont montré des anomalies du développement d'origine non génétique après l'ingestion de E171 à des doses équivalentes aux niveaux d'exposition observés chez l'Homme.

Des études menées *ex vivo* (sur segments d'artères sous-cutanées humaines) et chez le rat ont montré qu'une exposition au E171 à des doses élevées pouvait entraîner des effets cardiovasculaires susceptibles d'être facteur d'hypertension et d'insuffisance cardiaque.

Les récentes études de génotoxicité *in vitro* n'apportent pas de nouveaux éléments mais confirment que les dommages à l'ADN sont générés par le stress oxydant induit par le TiO₂. Cependant, les dernières études ne permettent pas d'exclure l'hypothèse d'un effet direct du TiO₂ sur l'ADN et/ou sur l'appareil mitotique qui pourrait être à l'origine des dommages.

Les études portant sur le pouvoir cancérigène signalent des modifications d'expression de gènes dans un modèle d'initiation/inflammation ainsi que des effets épigénétiques suggérés principalement par les modifications d'expression des histones, ce qui pourrait être en accord avec l'effet promoteur potentiel évoqué dans les études d'Ortega *et al.* (2016) et Bettini *et al.* (2017). De plus, les conclusions du NTP (1979) indiquent que « *le TiO₂ n'est pas cancérigène par exposition orale chez la souris, mais qu'une conclusion robuste ne peut pas être atteinte concernant le potentiel cancérigène de ce composé chez le rat* ».

Au vu de l'analyse des publications rapportées dans cet avis, le GECU propose les recommandations suivantes.

Dans son avis de 2017, l'Anses avait rappelé la nécessité de mettre en place des protocoles d'études de toxicologie et de caractérisations physico-chimiques adaptés aux nanomatériaux. Le GECU rappelle que la caractérisation du E171, et de toutes les substances constituées d'une fraction nanométrique, est une première étape indispensable et nécessaire à toutes les études d'identification du danger et de calcul d'exposition. Le GECU relève que la caractérisation des substances constituées d'une fraction nanométrique, notamment du E171, est devenue plus systématique et plus robuste du fait de l'utilisation de techniques analytiques adaptées et de la mesure de paramètres pertinents.

Au vu des résultats apportés dans les études de Proquin *et al.* (2018 a, b, c), le GECU réitère ses recommandations (Anses 2017) de confirmer l'effet promoteur potentiel du E171 observé au niveau du côlon *via* des expérimentations, en intégrant l'utilisation de plusieurs biomarqueurs (Aberrant crypt foci, mucin depleted foci, beta catenin accumulated crypt) et/ou portant sur des durées d'exposition plus longues afin d'évaluer l'induction tumorale. Un groupe supplémentaire composé d'un plus grand nombre d'animaux (par rapport à l'étude de Bettini *et al.* (2017)) est nécessaire afin de confirmer ou infirmer un potentiel effet initiateur du E171.

Des études de 2018 (Jovanovic *et al.*, Savic *et al.*) ont mis en lumière des anomalies du développement chez des invertébrés après exposition au E171, par conséquent, le GECU recommande d'explorer le potentiel toxique du E171 sur le développement des mammifères. Cette recommandation est appuyée par le manque de connaissances quant aux effets sur les organes reproducteurs et la perturbation endocrine soulignées par Heringa *et al.* (2016).

L'Efsa en 2018 a recommandé la conduite d'une étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération (EOGRTS, ligne directrice OCDE 443) du E171, ainsi qu'une meilleure évaluation du E171 tenant compte des interactions avec les matrices alimentaires. Le GECU souligne le fait que, dans le cas du E171, le test EOGRTS doit être réalisé dans sa version complète (datant de 2018) incluant l'étude des effets de toxicité du neuro-développement, de l'immunotoxicité

développementale et des paramètres endocriniens, notamment hormones sexuelles et thyroïdiennes.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'ANSES

L'Anses endosse les conclusions et recommandations du GECU.

A partir de la revue de la littérature réalisée par le GECU, 25 nouvelles études relatives à la toxicité du E171 par voie orale publiées depuis 2017 ont été recensées. Certaines de ces études ont mis en lumière, d'une part, de nouveaux signaux tels qu'une modification de la régulation des histones ou des anomalies du développement chez des invertébrés et, d'autre part, des effets génotoxiques in vitro via le stress oxydant (effets identifiés pour différentes formes de TiO₂ nano-particulaire, dont le E171). En outre, aucune de ces nouvelles études ne permet de confirmer ou d'infirmier le potentiel effet promoteur de la cancérogénèse du E171 rapporté dans l'étude de Bettini et al. (2017).

Au vu de ces éléments qui ne permettent pas de lever les incertitudes sur l'innocuité de l'additif E171, l'Anses réitère ses conclusions de 2017 (avis 2017-SA-0020). Elle recommande :

- De caractériser précisément, sur un plan physico-chimique, le E 171. Du fait de la grande hétérogénéité des lots de E171 produits et mis sur le marché, l'absence d'une caractérisation physico-chimique précise de cet additif alimentaire est aujourd'hui un frein à une évaluation des risques liés à sa consommation ;
- De mieux caractériser le danger éventuel du E171, ce qui nécessite l'acquisition rapide de données complémentaires permettant de statuer sur les différents signaux observés. Ces données concernent notamment les études de reprotoxicité, évoquées également par l'Efsa en 2016, les études de génotoxicité in vivo propres au E171, qui seront à conduire au vu des résultats obtenus in vitro. Dans un contexte d'usage large de l'additif alimentaire E171, autorisé dans 51 catégories alimentaires et sous le régime du *quantum satis* (aucune limite maximale n'est fixée, la substance étant dépourvue de DJA), la mise à disposition de ces éléments par les fabricants est attendue ;
- D'apprécier, dans le cadre de l'autorisation de mise sur le marché de l'additif, la justification de son usage pour le consommateur, qui doit être fondée sur des bénéfices clairement établis (intérêt technologique, impossibilité de substitution, utilité pour le consommateur ou la collectivité).

En outre, et dans l'attente d'une meilleure caractérisation du danger et des risques du E171, l'Anses rappelle ses conclusions générales antérieures relatives aux nanomatériaux visant à limiter l'exposition des travailleurs, des consommateurs et de l'environnement dans le cadre d'une approche graduelle, notamment en favorisant des produits sûrs et équivalents en termes de fonction et d'efficacité, dépourvus de nanomatériaux.

Dr Roger GENET

MOTS-CLES

E171, Dioxyde de titane, Additif alimentaire

KEYWORDS

E171, Titanium dioxide, Food additive

ANNEXE

ANNEXE 1 : Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : 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.

Membres du GECU

Mme Valérie FESSARD–Chef d'Unité–Anses- compétences en toxicologie
M. Fabrice NESSLANY–Directeur de laboratoire- compétences en toxicologie
Mme Paule VASSEUR– Professeur émérite- compétences en toxicologie

Coordination scientifique

M. Bruno TESTE – Chargé de projet scientifique – Anses
Mme Eleni ANASTASI – EU-FORA fellow (State General Laboratory of Cyprus / Anses)

ANNEXE 2: Données d'occurrence du E171 dans certaines catégories alimentaires

Dans l'optique d'identifier les niveaux de concentration du E171 au sein de différentes catégories alimentaires, le GECU a listé les données d'occurrence de cet additif alimentaire disponibles dans la littérature. Des informations additionnelles ont été obtenues auprès : des Agences européennes (EFSA) et nationales (RIVM), d'ONG (agir pour l'environnement) et de la DGCCRF dans le cadre du contrôle de l'étiquetage des nanomatériaux.

Selon le règlement CE n°1333/2008 [1], le TiO₂ est autorisé, en Europe, en tant qu'additif alimentaire (E171) en *quantum satis* dans 51 catégories alimentaires définies selon la réglementation [21].

Dans cette optique, deux approches ont été mises en place:

- L'utilisation de données correspondant à des niveaux d'usages rapportés par les industriels. Pour ces données, le GECU s'est basé sur les informations rapportées dans l'avis de l'Efsa (Efsa 2016) et le rapport du RIVM (2016). Des données de concentration (minimum, maximum, moyenne) ont été calculées pour chaque catégorie alimentaire lorsque les données étaient disponibles. Pour le calcul des moyennes, une approche par

pondération a été mise en place afin de combiner des données issues de sources différentes (notamment pour les données de l'Efsa et du RIVM).

- L'utilisation de données analytiques renseignant sur des niveaux de concentration du E171 dans différents produits alimentaires. Les informations relatives aux produits et aux méthodes analytiques ont été collectées dans l'optique de faciliter la catégorisation des produits alimentaires et d'évaluer la robustesse des mesures. Ainsi, 292 données issues de l'analyse de produits alimentaires ont été considérées, chaque produit alimentaire ayant été catégorisé selon l'approche FCS (food categorization system, catégorisation des aliments telle que renseignée dans le règlement CE n°1333/2008). Des concentrations (minimum, maximum et moyenne) en E171 ont été calculées pour chacune des catégories alimentaires.

Ainsi les concentrations de E171 dans les différentes catégories alimentaires calculées à partir des données d'usages rapportées par l'industrie et les données analytiques sont présentées dans le tableau 1. Les données d'occurrence pour 25 des 51 catégories alimentaires ont pu être renseignées.

Sur la base du recensement effectué, les plus fortes concentrations de E171 sont retrouvées dans quelques catégories alimentaires ; notamment, dans les confiseries, les succédanées de produits laitiers, les produits de boulangerie fine, les sauces et également dans les compléments alimentaires dans lesquels la concentration maximale a été mesurée (26950 mg/kg).

Tableau 1: Concentrations de l'additif alimentaire E171 en mg/Kg ou mg/L par catégorie alimentaire (selon la catégorisation FCS). Min, Moy et Maxi correspondent respectivement aux concentrations minimale, moyenne et maximale. Les données surlignées en gris en fin de tableau correspondent aux catégories alimentaires (1.1 ; 1.2 ; 1.7.2 ; 4.2.1 ; 4.2.6 ; 5.1 ; 9.1 et 11.4) pour lesquelles l'incorporation du E171 n'est pas autorisée.

Numéro FCS	Catégorie alimentaire	Nombre de données	Niveaux d'usage (industrie) ou données analytiques (mg/Kg or mg/L)			Type de données	Sources
			Min.	Moy.	Maxi.		
01.4	Produits laitiers fermentés aromatisés, y compris traités thermiquement	1		48		Industrie	[3]
01.6.3	Autres crèmes	1		1,2		Données analytiques	[6]
01.7.1	Fromages non affinés, à l'exclusion des produits relevant de la catégorie 16	5	0,3	0,9	1,5	Données analytiques	[5, 6]
01.7.5	Fromages fondus	8	0,4	2,3	11,5	Données analytiques	[6]
01.8	Succédanés de produits laitiers, y compris blanchisseurs de boissons	2	125	2563	5000	Industrie	[2, 3]
		11	10	1590	7820	Données analytiques	[5, 6, 11, 14, 15]
03	Glaces de consommation	23	1	398	1902	Industrie	[2, 3]
		2	0,1	0,2	0,4	Données analytiques	[11]
04.2.4.1	Préparations de fruits et de légumes, à l'exclusion des compote	2	0,3	0,3	0,3	Données analytiques	[11]
05.2	Autres confiseries, y compris les microconfiseries destinées à rafraîchir l'haleine	15	9,5	911	4500	Industrie	[2, 3]
		51	0,3	985	21940	Données analytiques	[5-8, 13, 15, 17, 19]
05.3	Chewing-gum	56	100	3563	16000	Industrie	[2, 3]
		37	0,3	2475	12100	Données analytiques	[4-11, 17, 20]
05.4	Décorations, enrobages et fourrages, à l'exclusion des fourrages à base de fruits relevant de la catégorie 4.2.4	27,0	0,1	728	20000	Industrie	[2, 3]
		7	1,1	2291	5988	Données analytiques	[5, 6, 14, 17]
06.3	Céréales pour petit-déjeuner	2	2,0	2,1	2,2	Données analytiques	[6]
06.7	Céréales précuites ou transformées	1		3,5		Données analytiques	[6]
07.2	Produits de boulangerie fine	5	76	754	2338	Industrie	[2, 3]
		22	0,3	608	4037	Données analytiques	[5, 6, 11, 15, 19, 20]
08.3.3	Boyaux, enrobages et décorations pour viande	2		18	35	Industrie	[2]

09.2	Poisson et produits de la pêche transformés, y compris mollusques et crustacés	40	0,4	6,8	135	Données analytiques	[12, 18]
12.4	Moutarde	1		0,3		Données analytiques	[5]
12.5	Soupes, potages et bouillons	1		193		Industrie	[2]
12.6	Sauces	24	500	1514	4000	Industrie	[2, 3]
		16	0,3	1360	7270	Données analytiques	[5, 6, 11, 17, 20]
12.7	Salades et pâtes à tartiner salées	7	83	83	83	Données analytiques	[8]
		1		2500	3000	Industrie	[2]
12.9	Produits protéiques, à l'exclusion des produits relevant de la catégorie 1.8	5	1700	3040	5000	Industrie	[3]
14.1.4	Boissons aromatisées	6		28	70	Industrie	[2]
		29	0,1	877	8320	Données analytiques	[6, 8, 11, 15]
15.1	Amuse-gueules à base de pommes de terre, de céréales, de farine, d'amidon ou de fécule	1		2,0		Données analytiques	[6]
15.2	Fruits à coque transformé	7	500	2398	7000	Industrie	[2, 3]
		2	1920	2460	3000	Données analytiques	[15]
16	Desserts, à l'exclusion des produits relevant des catégories 1, 3 et 4	3	130	153	200	Industrie	[2, 3]
		9	0,2	1779	12500	Données analytiques	[6, 11, 19]
17.1	Compléments alimentaires sous la forme solide, y compris sous forme de gélules et de comprimés et sous d'autres formes similaires, à l'exclusion des formes à mâcher	16	2	2626	12000	Industrie	[2]
		28	52	1349 5	26950	Données analytiques	[2, 11]
1.1	Lait pasteurisé et stérilisé (y compris par procédé UHT) non aromatisé	10	0,1	44,2	434	Données analytiques	[6, 11]
1.2	Produits laitiers fermentés non aromatisés, y compris le babeurre naturel non aromatisé (à l'exclusion du babeurre stérilisé), non traités thermiquement après fermentation	7	0,1	47,6	83	Données analytiques	[6, 8, 11]
1.7.2	Fromages affinés	2	1,1	1,4	1,7	Données analytiques	[6]
4.2.1	Fruits et légumes séchés	1		11,6		Données analytiques	[6]
4.2.6	Produits de pommes de terre transformés	1		3,0		Données analytiques	[6]
5.1	Produits de cacao et de chocolat visés dans la directive 2000/36/EC	19	0,3	503	4620	Données analytiques	[5-7, 15]

9.1	Poissons et produits de la pêche non transformés	9	1,7	8,1	20	Données analytiques	[12]
11.4	Edulcorants de table	2	0,3	0,3	0,3	Données analytiques	[5]

L'approche mise en place par le GECU présente plusieurs limitations et incertitudes.

Les produits alimentaires considérés dans cette étude proviennent de différents marchés (Europe, Chine, Etats-Unis, Australie, Jordanie, Corée). Le GECU ne s'est pas limité aux données issues des produits alimentaires fabriqués exclusivement en Europe étant donné que certains produits alimentaires sont issus de marques distribuées au niveau international. De plus, de nombreux produits importés de différents pays sont aujourd'hui disponibles dans des épiceries ou supermarchés spécialisés.

Les produits alimentaires ont été analysés à l'aide de techniques analytiques différentes (ICP-MS, ICP-HRMS, ICP-AES, spectrophotométrie UV, etc.). Les données de validation des mesures n'étaient pas systématiquement précisées hormis pour les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ).

Pour certaines données, les LOD et LOQ des méthodes rapportées dans les publications ont dû être calculées à partir des données issues des protocoles expérimentaux. Des différences significatives de LOD et de LOQ ont été observées entre les différentes techniques, néanmoins, malgré ces différences, aucune technique n'a été exclue. Dans le cas où le E171 n'est pas détecté (valeur < LOD) ou ne peut être quantifié (valeur < LOQ) au sein de la matrice alimentaire, le GECU a décidé d'assigner respectivement, comme niveau de concentration en E171, la valeur de la LOD ou de la LOQ de la technique impliquée dans la mesure (approche dite « upper bound »). Dans le cas où le E171 n'est pas détecté au sein de la matrice alimentaire et que les LOD et LOQ ne sont pas précisées, les données n'ont pas été exploitées.

Dans certains cas, la description des produits alimentaires n'a pas permis de catégoriser clairement ces produits selon les catégories alimentaires définies dans le règlement sur les additifs alimentaires (catégories FCS). En effet, certains produits dits chocolatés sont susceptibles de se retrouver dans plusieurs catégories alimentaires. Dans ce cas, les produits alimentaires ont été intégrés au sein des catégories alimentaires les plus globales en termes de description.

Les produits alimentaires tels que « raw milk » ou « ice », dont la description ne correspond à aucune catégorie alimentaire, ont été exclus (7 données exclues parmi les 292). Le GECU précise que dans le cas de ces données exclues, les concentrations en E171 étaient faibles (inférieure à 0,5 mg/kg).

Parmi les données analysées, certaines provenaient de catégories alimentaires pour lesquelles l'utilisation du E171 n'est pas autorisée par la réglementation. Ces quantités détectées peuvent s'expliquer par le « carry over » *i.e.* le E171 est apporté dans l'aliment final par d'autres ingrédients. La détection de E171 au sein de ces catégories alimentaires peut également s'expliquer par un bruit de fond analytique. Enfin, les difficultés de catégorisation des produits alimentaires, comme expliqué précédemment, peuvent également expliquer certains de ces résultats.

BIBLIOGRAPHIE

Publications issues de la recherche bibliographique du GECU

Dudefoi W., Moniz K., Allen-Vercoe E., Ropers MH., Walker VK. (2017). Impact of food grade and nano-TiO₂ particles on a human intestinal. Community. Food and Chemical Toxicology, 106, (2017), 242-249.

Dorier M., Béal D., Marie-Desvergne C., Dubosson M., Barreau F., Houdeau E., Herlin-Boime N., Carriere M. (2017). Continuous in vitro exposure of intestinal epithelial cells to E171 food additive causes oxidative stress, inducing oxidation of DNA bases but no endoplasmic reticulum stress. Nanotoxicology, 2017,11(6), 751–761.

Dorier M., Tisseyre C., Dussert F., Béal D., Arnal ME., Douki T., Valdiglesias V., Laffon B., Fraga S., Brandão F., Herlin-Boime N., Barreau F., Rabilloud T., Carriere M. (2018). Toxicological impact of acute exposure to E171 food additive and TiO₂ nanoparticles on a co-culture of Caco-2 and HT29-MTX intestinal cells. Mutat. Res. Gen. Tox. En., <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.004>.

Efsa (2018). Evaluation of four new studies on the potential toxicity of titanium dioxide used as a food additive (E 171) EFSA journal 2018;16(7)5366.

Freyre-Fonseca V., Medina-Reyesa EI., Téllez-Medinad DI., Paniagua-Contrerese GL., Monroy-Pérez E., Vaca-Paniagua F., Delgado-Buenrostro NL., Flores-Floresg JO., López-Villegasd EO., Gutiérrez-Lópezd GF., Chirinoa YI. (2018). Influence of shape and dispersion media of titanium dioxidenanostructures on microvessel network and ossification. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 162, (2018), 193–201.

Gea M., Bonetta S., Iannarelli L., Giovannozzi AM., Maurino V., Bonetta S., Hodoroaba VD., Armato C., Rossi AM., T. Schilirò. (2019). Shape-engineered titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs): cytotoxicity and genotoxicity in bronchial epithelial cells Food and Chemical Toxicology 127 (2019) 89–100.

Jensen DM., Christophersen DV., Sheykhzade M., Skovsted GF., Lykkesfeldt J., Münter R., Roursgaard M., Loft S., Møller P. (2018a). Vasomotor function in rat arteries after ex vivo and intragastric exposure to food-grade titanium dioxide and vegetable carbon particles. Particle and Fibre Toxicology (2018)15:12.

Jensen DM., Skovsted GF., Lykkesfeldt J., Dreier R., Berg JO., Jeppesen JL., Sheykhzade M., Loft S., Møller P. (2018b). Vasomotor dysfunction in human subcutaneous arteries exposed ex vivo to food-grade titanium dioxide. Food and Chemical Toxicology, 120, (2018), 321–327.

Jensen DM., Løhr M., Sheykhzade M., Lykkesfeldt J., Wils RS., Loft S., Møller P. (2019). Telomere length and genotoxicity in the lung of rats following intragastric exposure to foodgrade titanium dioxide and vegetable carbon particles. Mutagenesis, gez003, <https://doi.org/10.1093/mutage/gez003>.

Jovanović B., Jovanović N., Cvetković VJ., Matić S., Stanić S., Whitley EM., Mitrović TL. (2018). The effects of a human food additive, titanium dioxide nanoparticles E171, on *Drosophila melanogaster* - a 20 generation dietary exposure experiment. *Scientific reports* (2018) 8:17922.

Ma H., Lenz A., Gao X., Li S., Wallis LK. (2019). Comparative toxicity of a food additive TiO₂, a bulk TiO₂, and a nano-sized P25 to a model organism: the nematode *C. elegans*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2019), 26:3556–3568.

Proquin H., Rodríguez-Ibarra C., Moonen CGJ., Urrutia Ortega IM., Briedé JJ., de Kok TM., van Loveren H., Chirino YI. (2017). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*, 2017, 32, 139–149.

Proquin H., Jetten MJ., Jonkhout MCM., Garduño-Balderas LG., Briedé JJ., de Kok TM., Chirino YI., van Loveren H. (2018a). Gene expression profiling in colon of mice exposed to food additive titanium dioxide (E171). *Food and Chemical Toxicology* 111 (2018a) 153–165.

Proquin H., Jetten MJ., Jonkhout MC.M., Garduño-Balderas LG., Briedé JJ., deKok TM., Chirino Y., vanLoveren H. (2018b). Time course gene expression data in colon of mice after exposure to food-grade E171. *Data in Brief* 16(2018)531–600.

Proquin H., Jetten MJ., Jonkhout MCM., Garduño- Balderas LG., Briedé JJ., de Kok TM., van Loveren H., Chirino YI.(2018c). Transcriptomics analysis reveals new insights in E171-induced molecular alterations in a mouse model of colon cancer. *Sci Rep* (2018) 8:9738.

Radziwill-Bienkowska JM., Talbot P., Kamphuis JBJ., Robert V., Cartier C., Fourquaux I., Lentzen E., Audinot JN., Jamme F., Réfrégiers M., Bardowski JK., P. Langella, Kowalczyk M., Houdeau E., Thomas M., Mercier-Bonin M.(2018). Toxicity of Food-Grade TiO₂ to Commensal Intestinal and Transient Food-Borne Bacteria: New Insights Using Nano-SIMS and Synchrotron UV Fluorescence Imaging. *Frontiers in microbiology*; 2018; 9; 794.

Riedle S., Pele LC., Otter DE., Hewitt RE., Singh H., Roy NC., Powell JJ. (2017). Pro-inflammatory adjuvant properties of pigment-grade titanium dioxide particles are augmented by a genotype that potentiates interleukin 1 β processing. *Particle and Fibre Toxicology* (2017) 14:51.

Savić-Zdravković D., Jovanović B., ĐurCević A., Stojković-Piperac M., Savić A., Vidmar J. D. Milošević. (2018). An environmentally relevant concentration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induces morphological changes in the mouthparts of *Chironomus tentans*. *Chemosphere*, 211, (2018) 489-499.

Sohal IS., O'Fallon KS., Gaines P., Demokritou P., Bello D. (2018a). Ingested engineered nanomaterials: state of science in nanotoxicity testing and future research needs. *Part Fibre Toxicol.* 2018 ; 3;15(1):29.

Sohal IS., Cho YK., O'Fallon KS., Gaines P., Demokritou P., Bello D. (2018b) Dissolution Behavior And Biodurability Of Ingested Engineered Nanomaterials In The Gastrointestinal Environment. *ACS Nano*, 2018,12(8):8115-8128.

Talbot P., Radziwill-Bienkowska JM., Kamphuis JBJ., Steenkeste K., Bettini S., Robert V., Noordine ML., Mayeur C., Gaultier E., Langella P., Robbe-Masselot C., Houdeau E., Thomas M., Mercier-Bonin M. (2018). Food-grade TiO₂ is trapped by intestinal mucus in vitro but does not impair mucin O-glycosylation and short-chain fatty acid synthesis in vivo: implications for gut barrier protection. *J Nanobiotechnol.* (2018), 16:53.

Yusoff R., Nguyen LTH., Chiew P., Wang ZM., Ng KW. (2018a). Comparative differences in the behavior of TiO₂ and SiO₂ food additives in food ingredient solutions. *J. Nanopart. Res.* 20:76.

Yusoff R., Kathawala MH., Nguyen LTH., Setyawatia MI., Chiew P., Wub Y., Ch'ng AL., ZM. Wang, Nga KW. (2018b). Biomolecular interaction and kinematics differences between P25 and E171 TiO₂ nanoparticles. *Nanoimpact* 12, 51-57.

Winkler HC., Notter T., Meyer U., Naegeli H. (2018). Critical review of the safety assessment of titanium dioxide additives in food. *J. Nanobiotechnology.* 2018;1;16(1):51.

Zhang Z., Zhanga R., Xiao H., Bhattacharya K., Dimitrios Bitounis, Demokritou P., McClements DJ. Development of a standardized food model for studying the impact of food matrix effects on the gastrointestinal fate and toxicity of ingested nanomaterials. *NanoImpact* 13, (2019), 13–25.

Autres publications

Anses (2017). Demande d'avis relatif à l'exposition alimentaire aux nanoparticules de dioxyde de titane (Avis 2017-SA-0020).

Anses (2019) avis relatif à « la proposition de VTR chronique par voie respiratoire pour le dioxyde de titane sous forme nanométrique (avis 2017-SA-0162).

Bettini S., Boutet-Robinet E., Cartier C., Coméra C., Gaultier E., Dupuy J., Naud N., Taché S., Grysan 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. (2017). Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci Rep.* 2017, 7:40373.

Bockmann, J; Lahl H., Eckhert T. et al. (2000). Blood levels of titanium before and after oral administration of titanium dioxide. *Pharmazie* 55 (2), 140-143.

Charles S., Jomini S., Fessard V., Bigorgne-Vizade E., Rousselle C., Michel C. (2018). Assessment of the in vitro genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in a regulatory context. *Nanotoxicology.* 2018, 12(4):357-374.

Efsa (2012). Guidance for submission for food additive evaluations. *EFSA Journal* 2012;10(7):2760.

Efsa (2016). Re-evaluation of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFSA Journal* 2016;14(9):4545.

Guo Z., Martucci N., Moreno-Olivas F., Tako E. Mahler GJ. (2017). Titanium dioxide nanoparticle ingestion alters nutrient absorption in an in vitro model of the small intestine. *NanoImpact*, 2017, 5, 70–82.

Heringa MB., Geraets L., vanEijkeren JCH., Vandebriel RJ., deJong W., Oomen AG. (2016). Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations. *Nanotoxicology*, 10(10):1515-1525.

Jovanović B., Cvetković VJ., Mitrović TLJ., (2016). Effects of human food grade titanium dioxide nanoparticle dietary exposure on *Drosophila melanogaster* survival, fecundity, pupation and expression of antioxidant genes. *Chemosphere* 144, 43-49.

Kreyling WG., Holzwarth U., Schleh C., Kozempel J., Wenk A., Haberl N., Hirn S., Schäffler M., Lipka J., Semmler-Behnke M., Gibson N. (2017). Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. *Nanotoxicology*, 2017,11(4):443-453.

Kan H., Wu Z., Young SH., Chen TH., Cumpston JL., Chen F., Kashon ML., Castranova V. (2012). Pulmonary exposure of rats to ultrafine titanium dioxide enhances cardiac protein phosphorylation and substance P synthesis in nodose ganglia. *Nanotoxicology* 6 (7), 736-745.

Kan H., Wu Z., Lin YC., Chen TH., Cumpston JL., Kashon ML., Leonard S., Munson AE., Castranova V. (2014). The role of nodose ganglia in the regulation of cardiovascular function following pulmonary exposure to ultrafine titanium dioxide. *Nanotoxicology* 8 (4), 447-454.

Mohammadipour A., Fazel A., Haghiri H., Motejaded F., Rafatpanah H., Zabihi H., Hosseini M., Bideskan AE. (2014). Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 617–25.

Mohammadipour A., Hosseini M., Fazel A., Haghiri H., Rafatpanah H., Pourganji M., Bideskan AE. (2016). The effects of exposure to titanium dioxide nanoparticles during lactation period on learning and memory of rat offspring. *Toxicol. Indust. Health* 32 (2), 221-228.

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 (34), 4729-4735.

NTP (National Toxicology Program) 1979. Bioassay of TiO₂ for possible carcinogenicity. Tech. Rep. Ser. 97,1979.

Nurkiewicz T, Porter DW, Hubbs AF, Cumpston JL., Chen BT., Frazer DG., V. Castranova. (2008). Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction. *Part. Fibre Toxicol.* 5, 1.

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

Sprong, C., Bakker M., Niekerk M., Vennemann F. (2016). Exposure assessment of the food additive titanium dioxide (E 171) based on use levels provided by the industry. RIVM letter report 2015-0195, 2016.

Savi M., Rossi S., Bocchi L., Gennaccaro L., Cacciani F., Perotti A., Amidani D., Alinovi R., Goldoni M., Aliatis I., Lottici PP., Bersani D., Campanini M., Pinelli S., Petyx M., Frati C., Gervasi A., Urbanek K., Quaini F., Buschini A., Stilli D., Rivetti C., Macchi E., Mutti A., Miragoli M., Zaniboni M. (2014). Titanium dioxide nanoparticles promote arrhythmias via a direct interaction with rat cardiac tissue. *Part. Fibre Toxicol.* 2014, 11: 63.

Tassinari R., Cubadda F., Moracci G., Aureli F., D'Amato M., Valeri M., De Berardis B., Raggi A., Mantovani A., Passeri D., Rossi M., Maranghi F. (2014) Oral, short-term exposure to titanium

dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology* 8, 654–662.

Urrutia-Ortega IM., Garduño-Balderas LG., Delgado-Buenrostro NL., Freyre-Fonseca V., Flores-Flores JO., González-Robles A., Pedraza-haverri J., Hernández-Pando R., Rodríguez-Sosa M., León-Cabrera S., Terrazas LI., van Loveren H., Chirino YI. (2016). Foodgrade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model. *Food Chem. Toxicol.* 2016, 93, 20–31.

Vila L., Garcia-Rodriguez A., Marcos R., Hernandez A., (2018). Titanium dioxide nanoparticles translocate through differentiated Caco-2 cell monolayers, without disrupting the barrier functionality or inducing genotoxic damage. *J Appl Toxicol.* 2018,38(9):1195-1205.

Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H. et al. (2007). Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett.* 168, 176–85.

Wijnands MVM., van Erk MJ., Doornbos RP., Krul CAM., Woutersen RA. (2004). Do aberrant crypt foci have predictive value for the occurrence of colorectal tumours? Potential of gene expression profiling in tumours. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1629–1639.

Yang Y., Doudrick K., Bi X., Hristovski K., Herckes P., Westerhoff P., Kaegi R. (2014) Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles. *Environ. Sci. Technol.* 3;48(11):6391-40.

Bibliographie relative aux données d'occurrence du E171 (Annexe 2)

[1] Règlement CE n° 1333/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires.

[2] Efsa (2016) Re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive. *EFSA Journal*, 2016;14(9):4545.

[3] 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.

[4] Fiordaliso, F., et al., Realistic Evaluation of Titanium Dioxide Nanoparticle Exposure in Chewing Gum. *J Agric Food Chem*, 2018. 66(26): p. 6860-6868.

[5] Lomer, M.C., et al., Determination of titanium dioxide in foods using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analyst*, 2000. 125(12): p. 2339-43.

[6] Weir, A., et al., Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol*, 2012. 46(4): p. 2242-50.

[7] Kim, N., et al., Determination and identification of titanium dioxide nanoparticles in confectionery foods, marketed in South Korea, using inductively coupled plasma optical emission spectrometry and transmission electron microscopy. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2018. 35(7): p. 1238-1246.

- [8] Sharif, H., et al., Titanium dioxide content in foodstuffs from the Jordanian market: Spectrophotometric evaluation of TiO₂ nanoparticles. *International Food Research Journal*, 2015. 22(3): p. 1024.
- [9] Chen, X.X., et al., Characterization and preliminary toxicity assay of nano-titanium dioxide additive in sugar-coated chewing gum. *Small*, 2013. 9(9-10): p. 1765-74.
- [10] Dufouy, W., et al., Evaluation of the content of TiO₂ nanoparticles in the coatings of chewing gums. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2018. 35(2): p. 211-221.
- [11] Rompelberg, C., et al., Oral intake of added titanium dioxide and its nanofraction from food products, food supplements and toothpaste by the Dutch population. *Nanotoxicology*, 2016. 10(10): p. 1404-1414.
- [12] Yin, C., et al., TiO₂ particles in seafood and surimi products: Attention should be paid to their exposure and uptake through foods. *Chemosphere*, 2017. 188: p. 541-547.
- [13] de la Calle, I., et al., Towards routine analysis of TiO₂ (nano-) particle size in consumer products: Evaluation of potential techniques. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2018. 147: p. 28-42.
- [14] López-Heras, I. et al., Prospects and difficulties in TiO₂ nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 2014. 124: p. 71-78.
- [15] Lim, J.H., et al., Titanium Dioxide in Food Products: Quantitative Analysis using ICP-MS and Raman Spectroscopy. *J Agric Food Chem*, 2018.
- [16] Lim, J.H., et al., Detection and characterization of SiO₂ and TiO₂ nanostructures in dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 2015. 63(12): p. 3144-52.
- [17] Reed R, S.J., et al. Detecting engineered nanomaterials in processed foods from Australia: report prepared for friends of the earth by Arizona State University. 2015.
- [18] Taboada-Lopez, M.V., et al., Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS. *Talanta*, 2019. 195: p. 23-32.
- [19] Contrôle de la présence de nanoparticules dans les produits alimentaires et les cosmétiques menés par la DGCCRF.
- [20] Analyse de nanoparticules dans les aliments. Agir pour l'environnement 2016. <https://www.agirpourenvironnement.org/communiqués-presse/enquete-exclusive-des-analyses-revelent-la-presence-de-nanoparticules-dans-3980>
- [21] Guide décrivant les catégories alimentaires dans le règlement CE n° 1333/2008 Annexe II partie E version 5 (2017).
- [22] Dufouy, W., et al., Criteria to define a more relevant reference sample of titanium dioxide in the context of food: a multiscale approach. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2017. 34(5): p. 653-665.

[23] Yang, Y., et al., Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles. *Environ Sci Technol*, 2014. 48(11): p. 6391-400.

[24] Peters, R.J., et al., Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *J Agric Food Chem*, 2014. 62(27): p. 6285-93.

[25] Dorier, M., et al., Continuous in vitro exposure of intestinal epithelial cells to E171 food additive causes oxidative stress, inducing oxidation of DNA bases but no endoplasmic reticulum stress. *Nanotoxicology*, 2017. 11(6): p. 751-761.F.