

Etat des connaissances sur une approche globale de l'appréciation de l'innocuité appliquée à des migrants issus de matériaux au contact des denrées alimentaires

RÉSUMÉ

L'analyse de la littérature scientifique récente sur la faisabilité d'évaluer, à l'aide des tests *in vitro* ou *in vivo*, la toxicité de migrants issus de matériaux au contact des denrées alimentaires a été réalisée plus spécifiquement dans trois domaines de la toxicologie, à savoir la génotoxicité, la cytotoxicité et la perturbation endocrinienne. Cette synthèse a permis de mieux cerner les difficultés techniques liées à la réalisation d'essais toxicologiques, les migrants ne représentant que de faibles quantités de produits, non-identifiés ou partiellement identifiés.

Concernant l'évaluation de la cytotoxicité, une batterie de tests semble indispensable, afin de couvrir différents mécanismes d'action (survie ou développement cellulaire, altérations fonctionnelles, morphologiques, etc.). Cependant, leur intérêt peut paraître limité du fait leur manque de représentativité des effets *in vivo*.

L'évaluation de la génotoxicité par une batterie de tests serait en cohérence avec la réglementation actuelle des matériaux en contact des aliments et il est souhaitable qu'au moins un test de mutations géniques et un test d'aberrations chromosomiques soient effectués en premier lieu.

L'évaluation du potentiel de perturbation endocrinienne ne peut être réalisée qu'au moyen d'une batterie de tests *in vitro* et *in vivo*. En l'état actuel, ces tests ne paraissent pas suffisamment validés pour être pris en compte dans le cadre de l'évaluation des migrants. Il serait cependant nécessaire de suivre l'avancée des recherches dans ce domaine.

Aucun des tests identifiés dans ces trois domaines n'est apparu directement applicable aujourd'hui, dans le cadre d'une procédure d'évaluation de la toxicité des migrants issus de matériaux en contact des denrées alimentaires. L'une des raisons majeures concerne la problématique de l'échantillon à tester, sa méthode d'obtention, sa représentativité et la quantification (de manière globale) des produits de migration.

Il serait donc souhaitable que soient initiés, de façon prioritaire, des projets de recherche sur :

- la mise au point de micro-méthodes d'évaluation de la toxicité (tels que les essais sur plaque de microtitration) ;
- le développement de méthodes d'extraction et de préparation d'échantillons adaptées à l'évaluation des migrants issus de matériaux au contact des denrées alimentaires.

Par ailleurs, il convient de poursuivre une veille scientifique sur l'avancée des travaux dans le domaine de la cytotoxicité, de l'évaluation de la toxicité des mélanges et de la perturbation endocrinienne.

VALIDATION DU RAPPORT

Ce document a été validé par le Comité d'Experts Spécialisé "Matériaux au Contact des Denrées Alimentaires" lors de sa séance du 23 janvier 2006.

SOMMAIRE

1. Introduction	3
1.1. Contexte et enjeux	3
1.2. Objectifs de la saisine	3
1.3. Méthodologie.....	3
1.4. Définition d'un migrat	4
2. Réglementations	5
2.1. Réglementation et recommandations concernant l'évaluation des migrants issus de matériaux au contact des denrées alimentaires	5
2.2. Réglementation en vigueur concernant l'évaluation des migrants issus d'autres matériaux ..	5
2.2.1. Matériaux au contact de l'eau	5
2.2.2. Matériaux à usage médical	6
3. Tests de toxicité	7
3.1. Tests de cytotoxicité.....	7
3.1.1. Tests de cytotoxicité sur des extraits de papier ou carton	7
3.1.2. Tests de cytotoxicité sur les matériaux au contact de l'eau	8
3.1.3. Tests de cytotoxicité sur les migrants de polymères.....	8
3.1.4. Tests de cytotoxicité sur les biomatériaux	9
3.1.5. Bilan sur les essais de cytotoxicité.....	9
3.2. Tests de génotoxicité	10
3.2.1. Test de mutations géniques sur bactéries (Test d'Ames).....	10
3.2.2. Test de cytogénétique	11
3.2.3. Test des comètes	11
3.2.4. Test de dommages primaires à l'ADN.....	11
3.2.5. Bilan sur les essais de génotoxicité	11
3.3. Les autres tests <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	12
3.3.1. Analyse bibliographique des tests relatifs aux perturbateurs endocriniens	13
3.3.2. Bilan sur les essais de perturbation endocrinienne.....	14
4. Méthodologie d'évaluation des mélanges	15
5. Conclusions/Propositions	16
5.1. Conclusions.....	16
5.2. Propositions	17
6. Bibliographie	18
ANNEXE 1 : Proposition d'un arbre de décision pour l'évaluation de la toxicité des migrants issus de matériaux au contact alimentaire	20
ANNEXE 2 : Liste des participants	21
ANNEXE 3 : Glossaire	22

1. INTRODUCTION

1.1. Contexte et enjeux

Pour obtenir l'autorisation de mise sur le marché européen, les matériaux destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires doivent respecter le principe d'inertie énoncé dans le règlement N° 1935/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 27 octobre 2004 abrogeant les directives 80/590/CEE et 89/109/CEE (JOCE 13/11/04).

Ce règlement précise tout particulièrement que les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires doivent être suffisamment inertes pour ne pas céder à ces denrées des constituants en quantité susceptible :

- de présenter un danger pour la santé humaine
- d'entraîner une modification inacceptable de la composition des aliments
- ou d'entraîner une altération des caractères organoleptiques de celles-ci.

Ce règlement prévoit également des dispositions spécifiques pour certaines catégories de matériaux (matières plastiques, caoutchouc, etc.).

Ces mesures peuvent comporter :

- des listes positives de constituants autorisés ;
- les critères de pureté applicables à certains de ces constituants ;
- des conditions particulières d'emploi ;
- des limites de migration spécifique ;
- une limite de migration globale.

L'évaluation des risques sanitaires s'appuie essentiellement sur l'expertise toxicologique des constituants de départ pris individuellement et ne tient donc pas compte de la possibilité de synergie, d'additivité ou d'antagonisme des effets toxiques, ni d'éventuelles formations et migrations de composés « néoformés ».

Récemment, il a été proposé que cette évaluation soit complétée par une étude de la toxicité des migrants issus des matériaux et objets finis (Grob, 2002 ; Osaki et coll., 2004, 2005 ; International Life Science Institute, Food Packaging Ensuring the Safety, Quality and Traceability of Foods, Barcelona, November 2004).

Le CES MCDA a estimé souhaitable, dans ce contexte, d'examiner les bases scientifiques, la pertinence et la faisabilité d'approches globales de l'appréciation de l'innocuité, appliquées ou applicables à des migrants issus de matériaux au contact des denrées alimentaires.

Dans le cadre de son programme pluriannuel de réflexions, le CES MCDA s'est auto-saisi (saisine 2004-SA-0391) sur ce sujet.

1.2. Objectifs de la saisine

L'objectif de cette auto-saisine consiste, à partir d'une analyse de la littérature scientifique récente, à faire le point sur la faisabilité d'évaluer, à l'aide des tests *in vitro* et *in vivo*, la toxicité de migrants issus de matériaux au contact des denrées alimentaires.

Si, à l'issue de ce travail de synthèse, aucun des tests de toxicité *in vitro* et *in vivo* identifiés ne se révélait pertinent pour l'évaluation de la toxicité des migrants, il est envisagé de proposer quelques thèmes à développer dans un programme de recherche spécifique.

1.3. Méthodologie

La démarche retenue pour réaliser un état des connaissances scientifiques s'est appuyée sur 2 approches :

- une rencontre avec des spécialistes sur ce sujet,
- une analyse bibliographique.

La bibliographie utilisée repose sur des articles scientifiques traitant des tests toxicologiques susceptibles d'être appliqués aux migrants, et quelques-unes des méthodologies d'évaluation des risques liés aux mélanges de composés, identifiés ou non, présents à faible concentration.

La recherche bibliographique s'est principalement appuyée sur les banques de données suivantes : TOXLINE, MEDLINE, PUB MED, CURRENT CONTENTS, PASCAL.

Cette recherche a notamment mis en évidence :

- la rareté des travaux traitant strictement du sujet (les migrants) ;
- le peu d'articles traitant de l'analyse des mélanges complexes et de faible concentration ;
- le peu d'articles concernant l'analyse de la pertinence des moyens d'évaluation de la toxicité de mélanges complexes de très faible concentration ;
- les rares publications dans ce domaine concernent des mélanges de composés identifiés.

Plus de 80 articles ont été recueillis et analysés, en première intention, à l'aide de descripteurs simples. Seuls 33 articles ont été retenus et ont fait l'objet d'une analyse approfondie et d'une fiche de lecture.

Il est à noter que la bibliographie retenue est relativement récente puisque plus de 63 % des références datent des années 2000.

Années	1986	1988	1990	1994	1995	1996	1998	2000	2001	2002	2003	2004	2005	total
Nombre de publications retenues	1	1	1	2	2	1	4	2	4	4	2	5	4	33

1.4. Définition d'un migrant

Le migrant correspond à un transfert de l'emballage vers l'aliment d'un ensemble de composés sous la seule force motrice d'un gradient de concentration, sans modification des propriétés intrinsèques du matériau. Cependant en absence de définition officielle il est proposé de retenir la définition suivante :

« On entend par migrant, l'ensemble des substances cédées par un matériau à des denrées alimentaires en contact, dans des conditions proches des conditions réelles d'utilisation. Ces substances composent, en général, un mélange de produits non-identifiés ou partiellement identifiés, présents à des concentrations variables dans l'aliment ou le simulant d'aliment considéré ».

2. RÉGLEMENTATIONS

2.1. Réglementation et recommandations concernant l'évaluation des migrants issus de matériaux au contact des denrées alimentaires

Actuellement, la réglementation internationale ne propose aucun texte concernant l'évaluation de l'innocuité des migrants issus de matériaux au contact des denrées alimentaires.

A notre connaissance, aucune recommandation européenne ni ligne directrice n'a été publiée sur ce sujet.

2.2. Réglementation en vigueur concernant l'évaluation des migrants issus d'autres matériaux

Deux types de matériaux au contact font l'objet d'une réglementation spécifique qui fixe les critères d'acceptabilité de ces matériaux. Parmi ces critères existent des tests *in vitro* ou *in vivo* réalisés sur des migrants ou directement au contact du matériau :

- les matériaux au contact de l'eau,
- les matériaux à usage médical.

2.2.1. Matériaux au contact de l'eau

Les règles applicables aux matériaux en contact avec l'eau distinguent 2 types d'eaux destinées à la consommation humaine, dont la qualité et les modalités de contrôle sanitaire obéissent à des réglementations différentes.

a) *Les eaux conditionnées commercialisées sous le nom d'eau minérale naturelle, d'eau de source ou d'eau rendue potable par traitement et distribuées en bouteilles*

La qualité physico-chimique de ces eaux répondent aux dispositions de la directive 80/777/CE¹ (eaux minérales naturelles) et de la directive 98/83/CE² (eaux de source et eaux rendues potables par traitement).

Pour ces eaux et jusqu'au 31 décembre 2004, les matériaux au contact devaient faire l'objet d'une autorisation d'emploi délivrée au cas par cas par le Ministre chargé de la santé (Code de la santé publique, article R 1322-43 pour les eaux minérales naturelles et 1321-48 pour les autres eaux conditionnées), selon les modalités figurant dans la circulaire du 16 juillet 1971³. Les interactions entre le matériau et l'eau devant être aussi faibles que possible pour que l'eau conserve ses qualités d'origine.

Pour être autorisé, un matériau devait satisfaire aux prescriptions suivantes :

- chaque constituant devait être inscrit sur la liste des produits autorisés pour être au contact des denrées alimentaires ;
- la compatibilité bactériologique et physico-chimique du matériau avec l'eau devait avoir été vérifiée, les essais étant effectués par le Laboratoire d'Hydrologie de l'Afssa.

Depuis le 1^{er} janvier 2005, les matériaux de conditionnement sont soumis aux mêmes règles que les matériaux alimentaires, le principe d'une autorisation préalable d'emploi pour le conditionnement d'une eau ayant été supprimé. Une refonte de la réglementation des eaux minérales et des autres eaux est en préparation et doit accorder le droit français avec les règles communautaires du règlement 1935/2004⁴.

¹ Directive 80/777/CEE du Conseil, du 15 juillet 1980, relative au rapprochement des législations des États membres concernant l'exploitation et la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles (JOCE n° L 229 du 30/08/1980 p. 0001 – 0010)

² Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (JOCE n° L 330 du 05/12/1998 p. 0032 – 0054)

³ Circulaire du 16 juillet 1971 relative au conditionnement des eaux minérales (Journal officiel du 25 août 1971).

⁴ Règlement (CE) n° 1935/2004 du Parlement européen et du Conseil du 27 octobre 2004 concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires et abrogeant les directives 80/590/CEE et 89/109/CEE (JOCE n°L 338 du 13/11/2004, p. 0004 – 0017).

b) Les eaux potables distribuées par les réseaux publics ou privés

Pour la distribution de ces eaux, l'arrêté du 29 mai 1997⁵ modifié spécifie que les matériaux et objets utilisés dans les installations fixes de production, de traitement et de distribution d'eau destinée à la consommation humaine ne doivent pas être susceptibles d'altérer la qualité de l'eau telle que définie dans l'annexe I du décret 89/3⁶ du 3 janvier 1989 modifié.

Pour faciliter l'application de l'arrêté du 29 mai 1997, la circulaire DGS/VS4 n° 99-217 du 12 avril 1999⁷ relative aux matériaux utilisés dans les installations fixes de distribution d'eau destinée à la consommation humaine précise les modalités de l'évaluation de l'effet des matériaux sur la qualité de l'eau. Cette évaluation réalisée dans le cadre d'Attestation de Conformité Sanitaire (ACS) repose sur des essais d'inertie du matériau ou du produit fini. Un de ces essais vise à évaluer, selon la norme NF XP P 41-250-3 (Afnor 1996)⁸, l'effet cytotoxique éventuel des matériaux organiques sur des eaux à leur contact. La méthode consiste à mesurer l'inhibition de la vitesse de synthèse d'ARN de cellules humaines en culture (lignée HeLa S3).

2.2.2. Matériaux à usage médical

Les dispositifs et matériaux médicaux sont évalués, entre autres, par des essais de cytotoxicité *in vitro*.

En fonction de la nature du matériau et de son usage, 3 catégories d'essais peuvent être réalisés :

1. les essais utilisant un extrait,
2. les essais en contact direct,
3. les essais en contact indirect.

Les essais retenus et les critères de choix du mode d'exposition des cellules sont décrits dans la norme NF EN ISO 10993-5 (Afnor 1999)⁹. Cette norme spécifie les conditions d'extraction (solvants, couples durée/température), les conditions de contact direct ou indirect et le choix de témoins négatifs et positifs.

Les lignées cellulaires recommandées (mais non imposées) sont les CCL 1 (NCTC clone 929), CCL 163 (Balb/3T3 clone A31), CCL 171 (MRC-5) et CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) et CCL 10 [BHK-21 (C-13)] de l'American Type Culture Collection, et la V-79 379A.

Deux types d'essai peuvent être réalisés, permettant 2 types d'évaluation :

- a) **Une évaluation qualitative** : atteinte des cellules par observation en microscopie de la morphologie générale, de l'apparition de vacuolisations, d'un détachement, d'une lyse cellulaire ou d'une perte de l'intégrité membranaire.
- b) **Une évaluation quantitative** : mort cellulaire, inhibition de la croissance cellulaire, prolifération cellulaire ou formation de colonies. Mais aussi, nombre de cellules, taux de protéines, relargage d'enzymes ou d'un colorant vital, réduction d'un colorant vital, etc.

⁵ Arrêté du 29 mai 1997 relatif aux matériaux et objets des installations fixes de distribution d'eau destinée à la consommation humaine, modifié par l'arrêté du 24 juin 1998 (JO du 1er juin 1997 et BO min. Emploi n° 97/25 du 22 juillet 1997).

⁶ Décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles (J.O. du 4 avril 1989) modifié par le décret n° 90-330 du 10 avril 1990 (J.O. du 13 avril 1990), par le décret n° 91-257 du 7 mars 1991 (J.O. du 8 mars 1991) et par le décret n° 95-363 du 5 avril 1995 (J.O. du 7 avril 1995).

⁷ Circulaire DGS/VS 4 n° 99-217 du 12 avril 1999 relative aux matériaux utilisés dans les installations fixes de distribution d'eaux destinées à la consommation humaine. Direction générale de la santé. Sous-direction de la veille sanitaire. Bureau de l'eau. DGS/VS 4. NOR : MESP9930243C (Texte non paru au *Journal officiel*).

⁸ Afnor (1996) Norme NF XP P 41-250-3, effet des matériaux sur la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Matériaux organiques. Partie 3 : méthode de mesure de la cytotoxicité. Agence Française de Normalisation, Février 1996, 16 pages.

⁹ Afnor (1999) Norme NF EN ISO 10993-5. Évaluation biologique des dispositifs médicaux. Partie 5 : Essais concernant la cytotoxicité *in vitro*. Association Française de Normalisation (AFNOR), Décembre 1999, 24 pages.

3. TESTS DE TOXICITÉ

Dans une première approche, il a été procédé à l'examen des articles scientifiques ayant trait aux **tests *in vitro*** d'évaluation de la toxicité, de mélanges complexes et, quand cela fut possible, de faible concentration. Sur les bases des réglementations en vigueur dans le domaine de l'alimentation, 2 domaines d'investigation ont été retenus compte tenu de la fréquence des tests validés, de leur mise en œuvre souvent aisée et de leur utilisation en routine :

- cytotoxicité
- génotoxicité.

Par la suite, la démarche a été élargie vers d'autres domaines de la toxicologie.

Une analyse bibliographique critique est présentée ci-dessous.

3.1. Tests de cytotoxicité

Le principe général des tests de cytotoxicité consiste à mesurer, lors d'expositions à une substance, un ou différents effets critiques (« end-points » en anglais) sur des cellules en culture, tels que :

- survie des cellules,
- atteintes morphologiques de la cellule,
- atteintes du fonctionnement de la cellule (émission de lumière, inhibition de la synthèse d'ARN, inhibition de mobilité ...).

Si de très nombreux tests de cytotoxicité sont actuellement disponibles (plus de 26 ont été abordés lors d'un workshop international en 2000)¹⁰ aucun n'est validé pour, par exemple, la classification des substances chimiques où des tests *in vivo* sont encore préférés.

La littérature montre que divers tests de cytotoxicité ont été utilisés sur des extraits ou migrants de :

- papiers et cartons (Fauris et coll., 1998 ; Binderup et coll., 2002 ; Jondeau et coll., 2004 ; Von Wright et coll., 2004)
- matériaux au contact de l'eau (Fauris et coll., 1986)
- polymères tels que des bouteilles d'eau en PET (Sauvan et coll., 1994 ; Evandri et coll., 2000)
- biomatériaux (Srivastava et coll., 1990 ; Gehring, 1995).

Au regard des objectifs d'étude de la faisabilité de tests *in vitro* pour évaluer les migrants, le cas des papiers et cartons n'est pas *sensu stricto* un bon exemple car ce ne sont généralement pas des migrants qui sont collectés, mais des extraits (mise en solution du matériau et extraction aqueuse ou organique). Toutefois, la recherche bibliographique a montré un nombre intéressant d'études sur ces matériaux et il a semblé opportun de les présenter dans ce rapport.

De même, les biomatériaux (ou matériaux implantés dans l'organisme : cathéters, prothèses, ...) constituent également un exemple intéressant, bien que très éloignés de notre problématique car, pour leur acceptation, des bioessais sont nécessaires.

3.1.1. Tests de cytotoxicité sur des extraits de papier ou carton

Binderup et coll. (2002) ont réalisé des extractions aqueuses (10 g/250 ml pendant 24h) et éthanoliques (5 g/150 ml pendant 3h) de 4 papiers différents. Ces auteurs ont déterminé l'effet de ces extraits sur la survie de fibroblastes humains en culture. Les extraits éthanoliques se sont montrés plus cytotoxiques que les extraits aqueux ; le papier issu de fibres vierges était le moins toxique. Ces extraits ont également été évalués au moyen du test d'Ames, d'un test sur le potentiel oestrogénique et du test du CALUX (cf. 3.3.1).

¹⁰ Anonymous (2000), International Workshop on *In Vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity. Background Document. National Toxicology Program (NTP) / Interagency Center for the Evaluation of Alternative / Toxicological Methods (NICEATM) / National Institute of Environmental Health Sciences Research Triangle Park. Arlington, U.S.A .

Dans le cadre du programme européen BIOSAFE PAPER, Jondeau et coll. (2004) ont réalisé une pré-validation de 4 tests de cytotoxicité sur cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 (inhibition de la synthèse d'ARN, biotransformation du MTT, oxydation du colorant Alamar Blue™ et formation d'ATP) sur 13 substances potentiellement présentes dans les papiers. Le test le plus sensible est l'inhibition de la synthèse d'ARN. Les tests MTT et Alamar Blue™ sont rapides et relativement sensibles.

Toujours dans le cadre de ce programme européen, Von Wright et coll. (2004) ont évalué 5 tests de cytotoxicité à la fois sur des substances chimiques et sur des extraits aqueux de papiers et des extraits éthanoliques de bois (conditions d'extraction non spécifiées). Les tests évalués sont :

1. l'inhibition de la luminescence de la bactérie *Vibrio fischeri* ;
2. l'inhibition de la synthèse d'ARN de cellules HeLa et HepG2 (hépatocarcinome humain) ;
3. l'inhibition de mobilité de spermatozoïdes ;
4. l'inhibition de la croissance et de la survie de cellules d'hépatocarcinome (Hepa-1) de souris ;
5. l'inhibition de la croissance et de la survie de carcinomes du larynx (Hep-2) humains.

Les auteurs observent que si l'extrait éthanolique est plus toxique que l'extrait aqueux, il existe des différences importantes entre les réponses de ces 5 tests (sensibilité, faux positifs et faux négatifs) et que, par conséquent, une batterie de tests complémentaires est nécessaire.

Fauris et coll. (1998) ont évalué les migrants de 6 papiers et 15 cartons (obtenus selon les conditions de contact définies dans la directive 97/48/CE sur les matières plastiques). Ils ont réalisé une migration globale, des analyses chimiques des migrants et un essai d'inhibition de la synthèse de l'ARN sur cellules HeLa S3 humaines (essai normalisé pour évaluer les matériaux au contact de l'eau). Les résultats obtenus montrent des effets cytotoxiques des migrants. Les auteurs n'ont pas observé de corrélation avec les substances chimiques quantifiées mais une bonne corrélation avec la migration globale.

3.1.2. Tests de cytotoxicité sur les matériaux au contact de l'eau

Fauris et coll. (1986) ont évalué des matériaux au contact des eaux au moyen du test d'adhésion cellulaire et du test de synthèse d'ARN sur cellules HeLa S3 humaines. Huit matériaux ont été testés : 1 résine cationique, non traitée et traitée, 1 résine anionique non traitée et traitée, 1 résine époxydique, 1 revêtement en polychlorure de vinyle, 1 bitume et 1 téflon. Un témoin avec de l'eau ultra-pure a servi de référence. Les conditions de contact correspondent approximativement aux conditions d'utilisation des matériaux (3, 30 ou 60 cm²/L). Trois essais ont été réalisés dans (1) de l'eau ultra-pure pendant 24h, (2) de l'eau ultra-pure chlorée pendant 24h et (3) de l'eau ultra-pure pendant 48h.

Dans une première partie, les auteurs ont étudié l'influence de la température, de la durée d'incubation sur le test d'adhésion ainsi que sa reproductibilité.

Cette étude a montré que tous les matériaux sont cytotoxiques (cinétiques d'ancrage et synthèse d'ADN) et qu'il y a une bonne corrélation entre les réponses des deux tests. Le test d'adhésion est légèrement moins sensible mais il présente l'avantage d'être beaucoup plus facile à mettre en œuvre. On peut regretter que les raisons de cette toxicité n'aient pas été recherchées par des analyses chimiques spécifiques.

3.1.3. Tests de cytotoxicité sur les migrants de polymères

Evandri et coll. (2000) ont évalué les effets (sur la croissance racinaire d'*Allium cepa*) d'eaux contenues dans des bouteilles PET et verre ayant subi des conditions de stockage différentes. Les résultats obtenus indiquent des effets sur la croissance et la forme des racines des eaux conservées 8 semaines dans les bouteilles en PET à l'abri de la lumière à 18°C. L'allongement de la conservation à température plus élevée ou des variations importantes de température n'a pas induit d'effets sur la croissance racinaire. Les auteurs concluent que ces effets seraient liés aux composés volatils restant dans l'eau à faible température et passant dans l'atmosphère à fortes températures. Sur ces racines, l'index mitotique et les aberrations chromosomiques sont également mesurés (cf. 3.2.2).

Sauvant et coll. (1995) ont étudié l'inertie chimique et cytotoxique d'eaux désionisée et minérale au contact de polychlorure de vinyle (PVC), de polyéthylène téréphtalate (PET) et de verre. Ils ont testé à la fois les produits finis et les polymères en cours du procédé (résine de PET et « Compound » de PVC) mis en oeuvre à des températures différentes (200°C pendant 15 min. ou 270°C pendant 2h. Les essais sur l'eau désionisée ont été réalisés après un contact de 24h ou de 10 jours à 20°C. Les rapports surface/volume ne sont pas indiqués mais les auteurs spécifient avoir mis en contact 46 g PVC ou 72 g PET dans 1500 ml. Ces auteurs ont également évalué l'effet du stockage de l'eau minérale pendant 24 mois à 20°C sur la cytotoxicité.

Sur ces échantillons, des analyses chimiques de métaux, de monomère de chlorure de vinyle et d'acétaldéhyde ont été effectuées.

Les essais de cytotoxicité ont été réalisés sur des fibroblastes L-929. Les auteurs ont mesuré : la croissance cellulaire, l'intégrité membranaire (activité lactate déhydrogénase), la réduction du MTT (effets sur les mitochondries), l'incorporation de rouge neutre (effets sur les lysosomes), le relargage de rouge neutre (effet sur la perméabilité membranaire), le taux de protéines et l'inhibition de synthèse de l'ARN.

Les résultats montrent des effets cytotoxiques pour les échantillons issus des polymères en cours de procédé, (qui seraient liés, selon ces auteurs, à du relargage de zinc). Aucun effet n'a été mis en évidence sur les bouteilles finies en PVC ou PET quelles que soient les conditions. Les auteurs concluent que l'évaluation du produit fini est essentielle.

3.1.4. Tests de cytotoxicité sur les biomatériaux

Gehring (1995) a étudié l'influence de la stérilisation par ionisation de dispositifs médicaux sur la cytotoxicité et la biocompatibilité au moyen des tests MTT et « crystal violet » (CV). Dix matériaux agréés par la US Food and Drug Administration (FDA) ont été évalués : polystyrène, polyéthylène haute densité, copolymère PE/VA, homopolymère de polypropylène, polypropylène (résistant aux rayons gamma), polycarbonate, polycarbonate (résistant aux rayons gamma), polychlorure de vinyle, polychlorure de vinyle (résistant aux rayons gamma) et élastomère naturel. Six échantillons de chacun de ces matériaux ont été irradiés par des rayonnements gamma ou bêta aux doses de 0, 25 et 50 kGy, un échantillon non irradié servant de témoin.

Les extraits sont obtenus par contact de 1 cm² du matériau testé dans du milieu de culture des cellules (le volume n'est pas précisé) pendant 24h. Après incubation, le surnageant est recueilli et utilisé pour exposer les cellules.

A l'exception des essais sur l'élastomère naturel, aucun effet significatif de l'ionisation n'a été identifié par les tests de viabilité cellulaire (CV) ou de modification du métabolisme (MTT). Aucune différence n'est apparue entre les matériaux « normaux » et ceux certifiés comme résistants aux rayonnements gamma. Au regard des doses élevées d'irradiation, on peut regretter que des analyses chimiques n'aient pas été effectuées.

Srivastava et coll. (1990) présentent une nouvelle méthode *in vitro* consistant à fixer au moyen d'un adhésif acrylate une feuille du matériau à évaluer dans une boîte de pétri puis à introduire des fibroblastes L929 de souris. Après une incubation pouvant atteindre 5 jours à 37°C, le taux de croissance, la morphologie et éventuellement la survie (par coloration au bleu trypan) sont mesurés. Les auteurs utilisent également un témoin négatif (adhésif silicone) et un témoin positif (élastomère de latex). Ils concluent que la méthode est sensible, simple à mettre en oeuvre et rapide.

3.1.5. Bilan sur les essais de cytotoxicité

L'étude bibliographique réalisée a montré que divers essais de cytotoxicité ont été mis en oeuvre pour évaluer les dangers associés à des matériaux.

De façon schématique, 2 types d'essais ont été réalisés :

- sur la survie ou le développement des cellules (ce sont des essais faciles à mettre en oeuvre),
- sur des altérations des fonctions cellulaires (des méthodes simples existent également comme le MTT).

Les tests n'ont pu être comparés compte tenu des différences dans les matériaux testés, dans les méthodes de préparation des échantillons et dans les lignées cellulaires utilisées.

Quand plusieurs tests ont été mis en œuvre sur un même matériau, l'inhibition de la synthèse d'ARN sur cellules HeLa humaines en culture est apparue être le plus sensible. Mais ce test ne répond que pour un certain type de mécanisme d'action toxique. Comme le notent de nombreux auteurs, il apparaît nécessaire d'élaborer une batterie de tests de cytotoxicité permettant d'évaluer différents mécanismes d'action.

Mais l'application de ces tests se limite à un « screening » qualité des matériaux dans le principe du contrôle de l'acceptabilité des matériaux au contact des eaux ou de la biocompatibilité des biomatériaux. En effet, dans tous les cas, ils ne pourront pas être utilisés pour évaluer les risques car il est impossible d'extrapoler ces effets à des effets *in vivo*.

Si les perspectives sont intéressantes pour ces tests, généralement peu coûteux et faciles à mettre en œuvre, il semble cependant prématuré d'en recommander un seul ou même une batterie. En effet, il est indispensable de disposer préalablement d'une étude approfondie incluant différents matériaux, différentes méthodes de préparation des échantillons (extractions vs migrations), des migrats (migrations globales vs recherches spécifiques de substances) et bien entendu différents essais de cytotoxicité. Leur sensibilité devra être également étudiée. En effet, l'évaluation des matériaux au contact des aliments se fait actuellement *a priori* (sur les substances de départ avant tout procédé de mise en œuvre du matériau). Ces évaluations peuvent aboutir à la fixation de limites de migration spécifique (LMS) pour certaines substances. Des tests de cytotoxicité ne pourront donc être validés que s'ils permettent de détecter des effets à des concentrations inférieures ou égales à la LMS.

3.2. Tests de génotoxicité

Parallèlement aux substances identifiables et quantifiables analytiquement, la migration de produits à des concentrations inférieures au seuil de détection analytique est toujours possible. A ces faibles doses, des effets toxiques aigus ou chroniques sont peu probables. Cependant les substances génotoxiques peuvent induire des effets délétères pour la santé (cancer, malformations héréditaires) même à de très faibles doses.

Afin de détecter la présence de substances génotoxiques, un certain nombre de tests *in vitro* ont été appliqués aux migrats issus des emballages alimentaires. Pour le moment, les tests de génotoxicité ont été essentiellement appliqués à des migrats issus de matériaux plastiques et aux papiers et cartons, recyclés ou pas.

3.2.1. Test de mutations géniques sur bactéries (Test d'Ames)

Monarca et coll. (1994) ont étudié la mutagénicité d'une eau minérale naturelle bicarbonatée après un stockage de 1, 3 et 6 mois dans des bouteilles en PET coloré par rapport à de la même eau stockée dans des bouteilles en verre. Après une absorption sur des cartouches de silice, élution au méthanol puis évaporation, le résidu, dissous dans le DMSO, a été testé pour son activité mutagène dans le test d'Ames. Des doses de résidu équivalentes jusqu'à 4 litres/boîte ont été testées sur *Salmonella typhimurium* TA 98 et TA 100 avec et sans activation métabolique. Aucune augmentation significative de l'activité mutagène n'a été observée avec les bouteilles en PET par rapport aux bouteilles en verre.

Binderup et coll. (2002) ont testé des extraits alcooliques et aqueux de 3 échantillons de papiers recyclés par rapport à du papier vierge dans le test de mutation génique sur *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 97, TA 1535 et TA 102 en présence et en absence d'activation métabolique. Ils ont utilisé une méthode en micro-suspension qui a l'avantage d'être 10-20 fois plus sensible que la méthode standard d'Ames et nécessite une plus faible quantité d'échantillon. Aucun effet biologiquement significatif et reproductible n'a été observé jusqu'à des doses maximales correspondant à 100 (extrait aqueux) ou 150 (extrait alcoolique) mg papier/boîte.

Dans le cadre d'un programme européen de recherche de la DG XII (AIR 941025), différents échantillons de polymères ont été extraits avec de l'éthanol ou du diéthyl éther. Les extraits ont ensuite été directement testés en présence et en absence d'activation métabolique sur *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 97 et/ou TA 102 selon les méthodes d'incorporation directe (PP), en microsuspension (PP, PVC, LLDPE, PS crystal, PC, PET et PA) ou en spirale (PP, PA, PP block

copolymer, PS crystal et PET). Aux doses testées, jusqu'à 0,0045 dm²/boîte en microsuspension ou 9 dm²/ml par la méthode en spirale, aucun échantillon n'a induit d'effet mutagène.

3.2.2. Test de cytogénétique

Biscardi et coll. (2003) ont évalué tous les mois l'évolution de l'activité clastogène d'une eau minérale naturelle, bicarbonatée ou pas, après un stockage allant jusqu'à 12 mois dans des bouteilles en PET par rapport à la même eau à la sortie de la source. Il a utilisé un test micronoyaux sur une plante supérieure, un hydride de *Tradescantia* (Trad-MCN). Les inflorescences (parties terminales des tiges portant les fleurs) ont été exposées pendant 24h à un concentré (x50 ou x10) obtenu par lyophilisation de l'eau minérale et dilution avec une quantité d'eau distillée adéquate. Un seul résultat d'augmentation significative de la fréquence des micronoyaux a été observé avec l'eau minérale naturelle stockée pendant une période de 2 mois.

En plus des effets sur la croissance racinaire d'*Allium cepa* d'eaux contenues dans des bouteilles PET et verre ayant subi des conditions de stockage variables (voir section 3.1.3), Evandri et coll. (2000) ont aussi étudié l'induction d'aberrations chromosomiques. Ils ont montré que la fréquence des aberrations chromosomiques était plus élevée avec de l'eau embouteillée en PET par rapport à la même eau embouteillée en verre et cela quelles que soient les conditions de stockage.

3.2.3. Test des comètes

Dans les mêmes conditions de stockage que pour le test Trad-MCN, Biscardi et coll. (2003) ont évalué l'effet d'un extrait organique du lyophilisat d'eau minérale dans le test des comètes sur des leucocytes humains en culture primaire. Le test des comètes ou "Single Cell Gel Electrophoresis" est une technique microélectrophorétique rapide, simple et sensible qui permet de visualiser les cassures d'ADN (simples et doubles) chez des cellules eucaryotes individuelles. Une activité clastogène a été observée dans de nombreux échantillons d'eau minérale naturelle ou bicarbonatée mais sans corrélation avec la durée du stockage.

Ozaki et coll. (2004) ont aussi utilisé le test des comètes pour évaluer la génotoxicité de 8 échantillons de papiers et cartons, vierges ou recyclés, utilisés au contact alimentaire et trouvés positifs dans le Rec-assay (Cf 3.2.4). Il semblerait que les échantillons de papier aient été extraits à reflux pendant 2h avec de l'éthanol, mais le mode de préparation des échantillons pour les essais de génotoxicité n'est pas clairement explicité. Le test a été réalisé en utilisant des cultures de cellules HL-60 (cellule leucémique promyeloocytaire humaine). Six échantillons sur les 8 ont induit un effet génotoxique.

3.2.4. Test de dommages primaires à l'ADN

Ozaki et coll. (2004) ont également évalué l'activité génotoxique de 28 échantillons de papiers et cartons, vierges ou recyclés, utilisés au contact alimentaire dans le test de réparation de l'ADN sur bactérie. Ce test (Rec-assay) utilise des souches de *Bacillus subtilis* déficientes en système de recombinaison. Beaucoup de dommages à l'ADN sont réparés au travers des fonctions de recombinaison cellulaire dans les bactéries de type sauvage. Lors de l'exposition à une substance, l'augmentation de la létalité chez les bactéries déficientes (souche M45 *rec-*) par rapport aux bactéries de type sauvage (souche H17 *rec+*) est le signe d'une activité génotoxique. Treize échantillons sur les 28 ont montré une activité génotoxique dans ce test.

Hens et coll. (1988) ont soumis des échantillons de feuille de PVC, PS et PP aptes au contact alimentaire à une extraction à reflux (température non précisée) avec de l'eau distillée ou du n-hexane pendant 3h. Après concentration par évaporation, les extraits ont été testés sur des cultures de lymphocytes humaines pour l'induction d'échanges de chromatides sœurs. Aucun échantillon n'a induit d'effet statistiquement significatif.

3.2.5. Bilan sur les essais de génotoxicité

La bibliographie concernant l'application des tests de génotoxicité aux migrants ou extraits de matériaux au contact alimentaire est limitée. Divers tests ont été utilisés : le test de mutations géniques ou de réparation de l'ADN sur bactéries, le test d'aberrations chromosomiques sur des plantes supérieures, le test des comètes sur leucocytes humains ou cellules leucémiques et le test des échanges de chromatides sœurs sur lymphocytes humains. Les conditions d'extraction utilisées pour obtenir les échantillons sont très variables d'une étude à l'autre : absorption sur cartouche, lyophilisation, extraction avec de l'eau, de l'éthanol ou du n-hexane. De même, les conditions de mise en

œuvre des extraits sont très variables : utilisation directe de l'extrait, concentration, évaporation à sec et reprise par un solvant organique ou de l'eau, ou lyophilisation puis ré-extraction. Au final, il est difficile de se prononcer sur la sensibilité d'un test par rapport à un autre, compte-tenu du faible nombre de résultats disponibles.

En tout état de cause, il semble indispensable :

- d'harmoniser et de valider les méthodes d'extraction et de mise en contact avec les organismes cibles,
- de poursuivre le développement de micro-méthodes permettant de s'affranchir de l'extraction de grande quantité de matériaux,
- de réaliser des études comparatives entre les divers tests disponibles en routine et bien validés pour déterminer leur sensibilité dans le cas des mélanges complexes que sont les migrants.

3.3. Les autres tests *in vitro* et *in vivo*

La réglementation concernant les demandes d'autorisation d'emploi des substances utilisées pour la fabrication des matériaux au contact des denrées alimentaires prévoit la mise en œuvre ou le recensement d'études non génotoxiques (étude de toxicité subaiguë à 90 jours, toxicocinétique, reprotoxicité, tératogenèse, toxicité à long terme, sensibilisation, irritation cutanée et oculaire, toxicité respiratoire, ainsi que toutes données disponibles). Leur caractère obligatoire dépend du niveau d'exposition théorique calculé à partir d'essais de migration.

La bibliographie pertinente concernant les effets non génotoxiques des substances migrantes à partir de matériaux au contact des denrées alimentaires ou de biomatériaux est limitée à des matériaux de type polystyrène et exclusivement relative aux effets des perturbateurs endocriniens.

Selon la définition européenne, un perturbateur endocrinien est « *une substance ou un mélange exogène, altérant les fonctions du système endocrinien et induisant de ce fait des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou de sous-populations* »¹¹.

On considère que la perturbation endocrinienne concerne les interactions avec les systèmes oestrogéniques, androgéniques et/ou thyroïdiens, au niveau de la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'activité ou l'élimination des hormones naturelles agissant sur l'homéostasie, la reproduction, le développement ou le comportement des organismes.

L'évaluation du potentiel de perturbation endocrinienne n'est pas actuellement considérée en tant que telle dans les processus d'évaluation toxicologique, hormis lorsque des perturbations entraînent un effet néfaste pouvant être mis en évidence dans les études toxicologiques classiquement mises en œuvre. En effet, la perturbation endocrinienne serait susceptible d'exercer un effet néfaste sur la reproduction et le développement, voire sur la survenue de certains cancers.

Les denrées alimentaires et l'eau de boisson sont fréquemment évoquées comme des sources d'exposition aux substances suspectées de perturber la fonction endocrinienne. Dans le cadre de son Comité d'experts "Résidus et Contaminants Chimiques et Physiques", l'Afssa a engagé une réflexion sur ce sujet en se focalisant sur 6 groupes de contaminants de l'alimentation, pour lesquels des données expérimentales et d'exposition étaient disponibles. Cette réflexion, toujours en cours, s'est orientée vers un inventaire des méthodes d'évaluation et de détection des effets perturbateurs endocriniens et vers l'identification de tests à court terme qui seraient prédictifs d'un effet néfaste endocrinien à long terme.

¹¹ Stratégie communautaire concernant les perturbateurs endocriniens : une série de substances suspectées d'influer sur le système hormonal des hommes et des animaux, Communication de la Commission au Conseil et au Parlement Européen, Commission des Communautés Européennes, COM(1999) 706 final, Bruxelles, le 17 décembre 1999.

3.3.1. Analyse bibliographique des tests relatifs aux perturbateurs endocriniens

Les quelques publications qui traitent de l'évaluation de la perturbation endocrinienne en matière de substances migrantes à partir de matériaux au contact des denrées alimentaires ou de biomatériaux présentent des résultats négatifs au regard des tests utilisés.

Hirano et coll. (2001) ont évalué le potentiel de perturbation oestrogénique d'un trimère extrait de polystyrène (10 kg extraits à reflux par 20 L d'acétonitrile). Le test de liaison aux récepteurs œstrogéniques, l'E-screen (test de prolifération des cellules tumorales humaines MCF-7 en culture) et le test utéro-trophique sur rat femelle immature étaient négatifs. L'axe androgénique et l'axe thyroïdien n'ont pas été explorés.

Ohno et coll. (2003) ont évalué des dimères et trimères de styrènes susceptibles d'être retrouvés comme substances migrantes à partir de polystyrènes. Les substances ont été synthétisées chimiquement, mais leur migration a été mise en évidence dans des publications antérieures dont la pertinence n'est pas techniquement évaluable. Le test utéro-trophique sur rat femelle immature par voie sous-cutanée était négatif. Trois variations du test de liaison aux récepteurs oestrogéniques (radioactif et fluorescence) ont produit également des résultats négatifs, mais les oligomères étaient très faiblement solubles dans le milieu d'essai (Tris EDTA dithiothreitol glycerol). Le test de fixation aux récepteurs des oestrogènes en lien avec le gène rapporteur luciférase dans les cellules HeLa était négatif, les oligomères n'ont pas induit d'effet sur la transcription oestrogéno-dépendante.

Bachman et coll. (1998) ont effectué l'évaluation de l'effet oestrogénique des 23 échantillons issus de polystyrène préparés par Klärner et coll. (1998). Ces auteurs ont préparé des échantillons issus de migration de 23 polystyrènes ou polystyrènes expansés dans un liquide simulateur (composé d'eau et d'éthanol, 10 jours à 40°C, avec un ratio surface/volume de 56 dm².kg⁻¹ d'aliments) dans des conditions non représentatives, néanmoins plus drastiques que celles utilisées pour les mesures de migration.

Le test utéro-trophique effectué par Bachman et coll. (1998) chez le rat femelle immature (bien que non validé) est considéré, à l'heure actuelle, comme le test le plus fiable pour évaluer les effets oestrogéniques. Les tests d'activité œstrogénique, effectués selon des conditions très rigoureuses et conformes aux BPL, à des concentrations simulant la consommation humaine de 0,5 à 5 kg.j⁻¹ se sont révélés négatifs.

Date et coll. (2002) ont réalisé différents tests visant à mesurer la perturbation endocrinienne provoquée par des dimères et trimères de styrène synthétisés chimiquement mais susceptibles de migrer à partir de polystyrènes. Le test de liaison aux récepteurs oestrogéniques, le test de liaison aux récepteurs androgéniques, le test utéro-trophique, le test de Hershberger, le test de liaison aux récepteurs des hormones thyroïdiennes et le dosage de la prolactine sérique chez le rat se sont montrés négatifs.

Binderup et coll. (2002) ont mesuré l'activité oestrogénique d'extraits éthanoliques et aqueux de papiers de différentes natures par un test sur cellule de levure recombinante (YES test) (cf. 3.1.1). Les résultats du YES test sur ces extraits n'ont pas été conclusifs. Par ailleurs, ces auteurs ont effectué un essai CALUX (Chemically Activated Luciferase eXpression) pour évaluer les effets hormonaux dioxine-like. Le test CALUX s'est révélé faiblement positif pour certains extraits à la plus forte dose.

L'analyse bibliographique fait ressortir plusieurs points :

- Les tests utilisés *in vitro* et *in vivo* sont variés, reflétant la diversité des réponses susceptibles d'être induites par les composés perturbateurs.
- Les matériaux à la base de ces études sont quasi systématiquement des polystyrènes. L'étude de Binderup et coll. (2002) sur les extraits de papier doit être replacée dans le contexte du programme BIOSAFE PAPER et sort donc *de facto* du cadre de la saisine. En tout état de cause, son analyse en terme de perturbation endocrinienne n'est pas concluante.
- Les tests analysés sont tous négatifs, ce qui ne doit pas être interprété comme une évaluation négative du potentiel endocrinien, eu égard aux multiples formes que ce mécanisme d'action peut exprimer.

3.3.2. Bilan sur les essais de perturbation endocrinienne

En l'état actuel des connaissances, il n'est pas raisonnable de considérer la perturbation endocrinienne comme élément discriminant d'un éventuel arbre de décision concernant l'évaluation des substances migrantes à partir de matériaux au contact des denrées alimentaires. Mais, parce qu'elle constitue désormais un sujet de préoccupation majeur (CPP 2003)¹², qu'elle est susceptible d'induire des effets toxiques à plusieurs niveaux (reproduction, immunotoxicité, cancérogénicité) et qu'elle pourrait s'exprimer à de faibles doses, la perturbation endocrinienne serait susceptible d'entrer dans le cadre d'une prise de décision à un stade ultérieur, lorsqu'on disposera des outils méthodologiques adaptés.

En effet, il faut considérer :

- qu'il n'y a actuellement aucun test validé. L'OCDE travaille sur la validation de 3 tests représentatifs des 3 domaines : interactions oestrogéniques (test utéro-trophique), interactions androgéniques (test de Hershberger), interactions thyroïdiennes (la ligne directrice n°407 relative à la toxicité orale à doses répétées chez le rongeur pendant 28 jours a été modifiée pour prendre en compte le dosage des hormones thyroïdiennes) ;
- que la perturbation endocrinienne ne constitue pas un effet unique. A cet égard, l'approche du mécanisme d'action est un préalable indispensable à une évaluation du risque pertinent. Les travaux de l'EDSTAC, groupe de travail de l'US Environmental Protection Agency (EPA), ont conduit à recommander une évaluation à partir de scénarii de screening par batterie de tests. Le «tier 1», première batterie d'évaluation, vise à identifier les substances interagissant avec les systèmes oestrogéniques, androgéniques et thyroïdiens. Cette batterie inclut (avec cependant des alternatives possibles) 3 tests *in vitro*, 3 tests *in vivo* chez le mammifère et 2 tests *in vitro* chez le non mammifère (amphibien et poisson). L'EPA considère néanmoins que malgré le nombre de tests, certains effets puissent être ignorés par cette batterie, notamment lors des expositions prénatales. La batterie de tests du «tier 2» vise à caractériser la nature, le mécanisme et la relation dose-réponse du perturbateur endocrinien mis en évidence par la batterie du «tier 1». Son analyse ne serait requise que si une procédure de cet ordre était considérée valide dans le cas de l'évaluation des substances migrantes.

La démarche actuelle, qui consiste à n'évaluer que les substances de départ, occulte totalement la question des éventuelles interactions de synergie ou d'antagonisme, et en cela, l'intégration de l'évaluation des substances migrantes à partir des matériaux au contact des denrées alimentaires répond à une problématique sensible concernant les effets de perturbation endocrinienne. Malgré tout, il faut reconnaître que la bibliographie est pauvre et on peut regretter qu'elle ne concerne aucun composé issu d'autres matériaux que le polystyrène. En particulier, il n'existe pas de données sur des essais de toxicité non génotoxique concernant les substances migrantes à partir de vernis (qui aurait permis d'estimer l'impact du BADGE/BFDGE) ou de plastiques souples (pour les phtalates).

En conséquence, la prise en compte de la perturbation endocrinienne dans le cadre de l'évaluation des substances migrantes à partir des matériaux au contact des denrées alimentaires ne pourrait s'effectuer, si elle était jugée pertinente en temps qu'effet toxique discriminant au regard de la santé humaine, qu'au moyen d'une batterie de tests, dont aucun n'est actuellement validé. La réduction du nombre de tests nécessaire ne peut s'obtenir qu'au prix de l'investigation de la toxicocinétique de la (ou des) substance(s) en cause. Sans information de cette nature, la démarche de l'EDSTAC et donc la mise en œuvre d'une batterie de tests de type "1" ne peut pas être réduite sans préjudice sur la qualité de l'évaluation.

¹² CPP (2003) Les perturbateurs endocriniens : quels risques ? Comité de la Prévention et de la Précaution. Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. 15 pages

4. MÉTHODOLOGIE D'ÉVALUATION DES MÉLANGES

Des méthodologies destinées à évaluer le risque de mélanges de produits toxiques ont été publiées dans la littérature scientifique. Elles se basent généralement sur des modèles mathématiques qui nécessitent de connaître au préalable la toxicologie des composés chimiques, notamment leur mécanisme d'action et parfois leurs potentialités d'interactions (Hertzberg et Teuschler, 2002 ; Teuschler et coll., 2004 ; Chen et Lu, 2002 ; Chen et coll. 2001 ; Mumtaz et coll. 1998 ; Holmes et coll., 2005 ; Franz, 2005 ; Petersen et coll., 2005). Dans le cas des migrants, les molécules sont généralement inconnues et si ce n'est pas le cas, les informations toxicologiques disponibles sont très rares et partielles. Il est donc impossible d'utiliser ces méthodes pour évaluer les risques des mélanges présents dans les migrants, sauf cas particuliers où les substances seraient clairement identifiées – du moins les principales – (Groten et coll., 2001, proposent les dix premières substances en quantité les plus importantes) et que les substances restantes ne dépassent pas une quantité maximale restant à définir.

Eide et coll. (2004) ont proposé une stratégie d'évaluation de la mutagénicité de mélanges complexes à partir des profils chromatographiques des extraits des mélanges. Ils proposent d'évaluer la toxicité de mélanges complexes par traitement multivarié des matrices décrivant respectivement le profil des mélanges et le résultat du test toxicologique (qu'il est suggéré de remplacer par une batterie de tests toxicologiques).

L'évaluation des mélanges de substances peut également être réalisée en utilisant des tests toxicologiques classiques.

Toutefois, les études toxicologiques *in vivo* chez l'animal semblent difficilement réalisables d'un point de vue technique, du fait des faibles quantités de produits disponibles.

Quant aux tests toxicologiques *in vitro*, ils se heurtent à certaines difficultés décrites dans les chapitres précédents.

5. CONCLUSIONS/PROPOSITIONS

5.1. Conclusions

L'objectif de cette auto-saisine consistait à faire le point sur la faisabilité d'évaluer, à l'aide de tests *in vitro* et *in vivo*, la toxicité de migrants issus de matériaux au contact des denrées alimentaires.

Il est important de préciser que l'évaluation de la toxicité des migrants ne se substituerait pas à celle des constituants de départ mais pourrait être envisagée en complément de l'évaluation réglementaire actuelle de l'innocuité des matériaux au contact des denrées alimentaires. Cette démarche irait dans le sens de la recherche d'une meilleure sécurité sanitaire pour le consommateur.

L'analyse de la littérature s'est orientée autour de trois types de tests (tests de cytotoxicité, tests de génotoxicité, tests relatifs aux perturbateurs endocriniens), des méthodologies d'évaluation des mélanges et d'en évaluer leur applicabilité aux migrants.

Les principales conclusions de cette réflexion sont exposées sous forme de 3 grandes questions :

1 - Existe-t-il des méthodologies permettant de caractériser le danger de mélanges complexes de substances non identifiées et présentes à très faible concentration ?

L'analyse de la littérature scientifique montre que quelques équipes ont abordé cette question.

Les tests mis en œuvre et les matériaux évalués sont très variables. De plus, le nombre d'études pertinentes est très limité. Ainsi, aucun des tests identifiés n'est apparu suffisamment éprouvé et validé pour être appliqué, aujourd'hui, dans le cadre d'une procédure d'évaluation de la toxicité des migrants issus de matériaux en contact des denrées alimentaires.

Par ailleurs, il est également apparu qu'il n'était pas raisonnablement possible de réaliser une telle évaluation sans une bonne connaissance de la nature même des échantillons recueillis et des conditions de leur obtention. En effet plusieurs questions se sont d'emblée imposées :

- Doit-on travailler sur un extrait ou un migrant ?
- Sur quel substrat : extrait ou denrée alimentaire ou liquide simulateur ?
- Si le choix se porte sur un extrait, quelle est la représentativité de l'extrait : extraction totale ou non ?
- Comment qualifier et quantifier l'extrait ou le migrant si nécessaire ?
- Dans les tests de toxicité, comment contrôler/éviter d'éventuelles interférences du solvant ?

Sur le plan technique, la plupart de ces tests requièrent donc au préalable l'obtention et la préparation d'échantillons en quantité et en concentration suffisantes, notamment en ce qui concerne les tests *in vitro* de génotoxicité. Les migrants étant des mélanges de composés non identifiés à des concentrations variables, il semblerait nécessaire de développer des protocoles d'extraction adaptés et compatibles avec les organismes cibles (bactérie, levure, cellules de mammifères, ...).

Le développement de micro-méthodes d'évaluation de la toxicité devrait être privilégié afin de s'affranchir de l'extraction de grandes quantités de matériaux (tels que les essais sur plaque de microtitration).

2 – Quels tests pourraient être envisagés pour évaluer la toxicité des migrants issus des matériaux au contact alimentaire?

Concernant l'évaluation de la cytotoxicité, la littérature a montré qu'un grand nombre de tests a été utilisé pour évaluer des migrants ou des extraits de matériaux. Parmi ces tests, il faut distinguer ceux portant sur la survie cellulaire de ceux mesurant l'altération de certaines fonctions cellulaires.

Une batterie de tests semble indispensable pour évaluer le potentiel cytotoxique des migrants. Cependant, leur intérêt semble limité du fait d'une part, de la non spécificité des mécanismes d'action mis en jeu et, d'autre part, de leur manque de représentativité des effets *in vivo*.

Toutefois, de tels tests sont déjà utilisés dans les protocoles de demande d'autorisation d'emploi ou de mise sur le marché (biomatériaux, matériaux au contact de l'eau), il serait donc souhaitable que ces tests soient évalués en parallèle des autres tests préconisés par le groupe de travail.

Concernant l'évaluation de la génotoxicité, une batterie de tests serait en cohérence avec la réglementation actuelle des matériaux en contact des aliments et sa prise en compte permettrait de mieux évaluer le risque cancérigène. Le choix entre 2 et 3 tests est difficile à faire et n'est pas spécifique de la problématique des migrants. Actuellement, la plupart des réglementations récentes européennes et françaises ont tendance à préférer 3 tests, sans que l'argumentaire scientifique de cette démarche soit clairement explicité. Parmi l'ensemble des tests actuellement pratiqués, le choix devrait couvrir différents mécanismes d'action. En ce sens, il est recommandé qu'au moins la mutation génique et l'aberration chromosomique soient évaluées.

La problématique des perturbateurs endocriniens est une préoccupation actuelle importante. Cependant, d'après la littérature, l'évaluation de la perturbation de la fonction endocrinienne ne peut être réalisée au moyen d'un seul test. Elle est généralement abordée au travers d'une batterie de tests *in vitro* et *in vivo* (par exemple, 8 tests pour la première phase d'évaluation préconisée par l'US-EPA).

En l'état actuel, ces tests ne paraissent pas suffisamment validés pour être pris en compte dans le cadre de l'évaluation des migrants. Il serait cependant nécessaire de suivre l'avancée des recherches dans ce domaine.

Enfin, un certain nombre de méthodes, généralement mathématiques (analyse multifactorielle), ont été proposées pour évaluer la toxicité des mélanges de substances chimiques. Dans la grande majorité des cas, elles s'appliquent à des mélanges de composés connus, ce qui n'est pas le cas des migrants. Un suivi des recherches dans ce domaine serait également nécessaire afin d'en évaluer la pertinence au regard de l'évaluation des migrants issus de matériaux au contact alimentaire.

3 – Comment interpréter les résultats ?

Les questions récurrentes à ce type de problématique restent ici d'actualité.

L'utilisation de ces tests, lorsque les difficultés techniques seront surmontées, posera un certain nombre de questions non développées dans le cadre de ce travail :

- extrapolation à l'homme ;
- spécificité des tests pratiqués ;
- sensibilité ;
- limitation des faux positifs et surtout des faux négatifs.

5.2. Propositions

Il s'avère prématuré de proposer une démarche d'évaluation de la toxicité des migrants au moyen de tests *in vitro*.

Le présent travail pourra être réactualisé lorsque les résultats du programme Européen BIOSAFEPAPER seront disponibles (fin 2006). En effet, au cours de ce programme, un nombre important de bioessais a été évalué pour les papiers et cartons au contact des aliments. Les résultats devraient donc permettre d'affiner la réflexion.

En revanche, il serait utile que soient initiés des projets de recherche liés à cette thématique, tels que la mise au point d'essais toxicologiques *in vitro* adaptés à des faibles quantités et l'obtention d'échantillons représentatifs de la migration. Ce projet devrait être prioritaire : le soutien d'équipe de recherche sur cette problématique permettrait non seulement d'améliorer les connaissances scientifiques mais également d'apporter des compétences indispensables pour accroître la sécurité des MCDA et éventuellement orienter les futures réglementations. Une telle méthodologie serait également applicable au cas des matériaux qui sont peu ou pas réglementés : bois, papiers/cartons, encres, effets des procédés ...

En outre, les avancées apportées par ces recherches permettraient de valider un arbre de décision quant à l'utilisation de ces tests dans l'évaluation du risque lié aux migrants issus de matériaux au contact alimentaire, tel que celui élaboré dans le présent travail et présenté en annexe.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Anonymous (2000), International Workshop on *In Vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity. Background Document. National Toxicology Program (NTP) / Interagency Center for the Evaluation of Alternative / Toxicological Methods (NICEATM) / National Institute of Environmental Health Sciences Research Triangle Park. Arlington, U.S.A
- AIR 941025. EU DG XII research programme (1994-1997). Safety and quality control of plastics materials for food contact. Synthetic report. <http://cpf.jrc.it/webpack/downloads/AIR%20941025%20Report-link%20from%20PG.doc>
- Bachmann S., Hellwig J., Jackh R., Christian M. (1998). Uterotrophic assay of two concentrations of migrates from each of 23 polystyrenes administered orally (by gavage) to immature female wistar rats : Uterotrophic assays of polystyrenes. *Drug and Chemical Toxicology - New-York - NY* 1978. **21**, 1-30.
- Binderup M.-L., Pedersen G. A., Vinggaard A. M., Rasmussen E. S., Rosenquist H., Cederberg T. (2002). Toxicity testing and chemical analyses of recycled fibre-based paper for food contact. *Food Additives and Contaminants* **19** (Supplement), 13-28.
- Biscardi D., Monarca S., De Fusco R., Senatore F., Poli P., Buschini A., Rossi C., Zani, C. (2003). Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by Tradescantia/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS. *Science of the Total Environment* **302**(1-3), 101-108.
- Chen CY, Lu CL. (2002). An analysis of the combined effects of organic toxicants. *Science of the Total Environment* **289**(1-3), 123-32.
- Chen JJ., Chen YJ., Rice G, Teuschler LK., Hamernik K., Protzel A., Kodell RL. (2001). Using dose addition to estimate cumulative risks from exposures to multiple chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **34**(1), 35-41.
- Date K., Ohno K., Azuma Y., Hirano S., Kobayashi K., Sakurai T., Nobuhara Y., Yamada T. (2002). Endocrine-disrupting effects of styrene oligomers that migrated from polystyrene containers into food. *Food and Chemical Toxicology* **40**(1), 65-75.
- Eide I., Neverdal G, Thorvaldsen B, Arneberg R, Grung B, Kvalheim O. (2004). Toxicological evaluation of complex mixtures : fingerprinting and multivariate analysis. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **18**, 127-133.
- Evandri MG., Tucci P., Bolle P. (2000). Toxicological evaluation of commercial mineral water bottled in polyethylene terephthalate: a cytogenetic approach with *Allium cepa*. *Food Additives and Contaminants* **17**(12), 1037-1045.
- Fauris C., Lundstrom H., Vilagines R. (1998). Cytotoxicological safety assessment of papers and boards used for food packaging. *Food Additives and Contaminants* **15**(6), 716-728.
- Fauris C., Danglot C., Lundstrom H., Vilagines R. (1986). Mesure de la toxicité induite par les matériaux en contact avec l'eau potable. *Journal français d'hydrologie* **17**(2) 131-142.
- Franz R. (2005). Migration modeling from food-contact plastics into foodstuffs as a new tool for consumer exposure estimation. *Food Additives and Contaminants* **20**(10), 920-937.
- Gehring J. (1995).The influence of ionizing radiation (beta/gamma) on various polymers based on the result of the cytotoxicity test. *Radiation Physics and Chemistry* **46** : 4-6, Proceedings of the 9th International Meeting on Radiation Processing, 1994, Pt. 1, 617-622.
- Grob K. (2002). Comprehensive analysis of migrates from food-packaging materials: a challenge. *Food Additives and Contaminants* **19**(Sup.), 185-191.
- Groten JP., Feron VJ., Suhnel J. (2001). Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends in Pharmacological Sciences* **22**(6), 316-322.
- Hens L., Segers H., Van Emelen E., Liebaers I., Lox F., Susanne C. (1988). S.C.E.-testing of packaging material extracts and monitoring well water from waste deposit series. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Biology* **36**, 235-242.
- Hertzberg R.C., Teuschler L.K. (2002). Evaluating Quantitative Formulas for Dose-Response Assessment of Chemical Mixtures. *Environmental Health Perspectives* **110**(6), 965-970.
- Hirano S., Tanaka M., Date K., Ohno K., Kobayashi K., Sakurai T., Nagao Y., Nobuhara Y., Yamada T. (2001). Identification, determination, and biological evaluation of a novel styrene trimer contained in polystyrene food containers. 2. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**(8), 4127-4131.
- Holmes M.J., Hart A., Northing P., Oldfring P.K.T., Castle L., Stott D., Smith G., Wardman O. (2005). Dietary exposure to chemical migrants from food contact materials : a probabilistic approach. *Food Additives and Contaminants* **22**(10), 97-919.
- Jondeau A., Allou K., Lhuguenot J.C. and Chagnon M.C. (2004). comparison of cytotoxicity assays in order to ensure safety of food contact materials of food contact materials. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Food Packaging*. Barcelona, Spain (<http://europe.ilsa.org/mailto:info@ilsa.org>)
- Klarner P., Klenz R., Eder R., Volz WE., Schnell HW., Leyendecker D., Guntner A., Niessner N., Morris CR., Christian MS. (1998). Preparation and analysis of styrene oligomers containing migrates from various polystyrenes used in food packaging : Uterotrophic assays of polystyrenes. *Drug and chemical toxicology* **21**(supl 1), 31-49.
- Monarca S., De Fusco R., Biscardi D., De Feo V., Pasquini R., Fatigoni C., Moretti M., Zanardini A. (1994). Studies of migration of potentially genotoxic compounds into water stored in PET bottles. *Food and Chemical Toxicology* **32**(9), 783-788.

- Mumtaz M.M., De Rosa C.T., Groten J., Feron V.J., Hansen H., Durkin P.R. (1998). Estimation of Toxicity of Chemical Mixtures through Modeling of Chemical Interactions. *Environmental Health Perspectives* **106**(Suppl 6),1353-1360.
- Ohno K., Azuma Y., Date K., Nakano S., Kobayashi T., Nagao Y., Yamada T. (2003). Evaluation of styrene oligomers eluted from polystyrene for estrogenicity in estrogen receptor binding assay, reporter gene assay, and uterotrophic assay. *Food and Chemical Toxicology* **41**(1), 131-141.
- Ozaki A., Yamaguchi Y., Fujita T., Kuroda K., Endo G. (2004). Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. *Food and Chemical Toxicology* **42**(8), 1323-1337.
- Ozaki A., Yamaguchi Y., Fujita T., Kuroda K., Endo G. (2005). Safety assessment of paper and board food packaging : chemical analysis and genotoxicity of possible contaminants in packaging. *Food Additives and Contaminants* **22**(10), 1053-1060.
- Petersen J.H., Trier X.T., fabech B. (2005). Mathematical modelling of migration : a suitable tool for the enforcement authorities. *Food Additives and Contaminants* **20**(10), 938-944.
- Sauvant MP., epin D., ohatier J., roliere CA., Veyre A. (1994). Comparative study of two in vitro models (L-929 fibroblasts and Tetrahymena pyriformis GL) for the cytotoxicological evaluation of packaged water. *Science of the Total Environment* **156**(2), 159-167.
- Sauvant MP., Pepin D., Bohatier J. (1995). Chemical and in vitro toxicological evaluations of water packaged in polyvinyl chloride and polyethylene terephthalate bottles. *Food Additives and Contaminants* **12**(4), 567-584.
- Srivastava S., Gorham SD., Courtney JM. (1990). Screening of in vitro cytotoxicity by the adhesive film test. *Biomaterials* **11**(2), 133-137.
- Teuschler LK., Rice GE., Wilkes CR., Lipscomb JC., Power FW. (2004). A feasibility study of cumulative risk assessment methods for drinking water disinfection by-product mixtures. *Journal of Toxicology and Environmental Health, A* **67**(8-10), 55-77.
- Von Wright A., Honkalampi-Hämäläinen U., Stamatii A.L., Zucco F., Turco L., Séverin I., Dahbi L., Savolainen M., Andersson M., Salkinoja-Salonen M. Lhuguenot J.C. and Weber A. (2004). Comparison of cytotoxicity assays on different cell lines to assess safety of packaging materials. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Food Packaging*. Barcelona, Spain (<http://europe.ilsa.org/mailto:info@ilsa.org>).

ANNEXE 1

PROPOSITION D'UN ARBRE DE DÉCISION POUR L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES MIGRATS ISSUS DE MATÉRIAUX AU CONTACT ALIMENTAIRE

L'arbre de décision présenté dans ce rapport est une première étape dans l'élaboration de la démarche d'évaluation de la toxicité des migrants et en aucun cas la finalité de cette réflexion.

1. La préparation des échantillons à tester :

Avant d'aborder l'évaluation de l'innocuité proprement dite à l'aide de tests toxicologiques, il apparaît nécessaire de répondre à certaines questions afin de préciser ce que l'on entend par la dénomination "migrat" et de quelle manière doit être préparé l'échantillon sur lequel se base cette démarche d'évaluation.

- Sur les extraits directement (conditions d'extraction à définir) ?
- Sur la denrée alimentaire conditionnée ?
- Sur les liquides simulateurs obtenus après mise en contact avec le matériau, dans des conditions proches de la réalité (durée, température) ?
- Les extraits ou les migrants obtenus sont-ils utilisables dans les tests de toxicité *in vitro* proposés ?

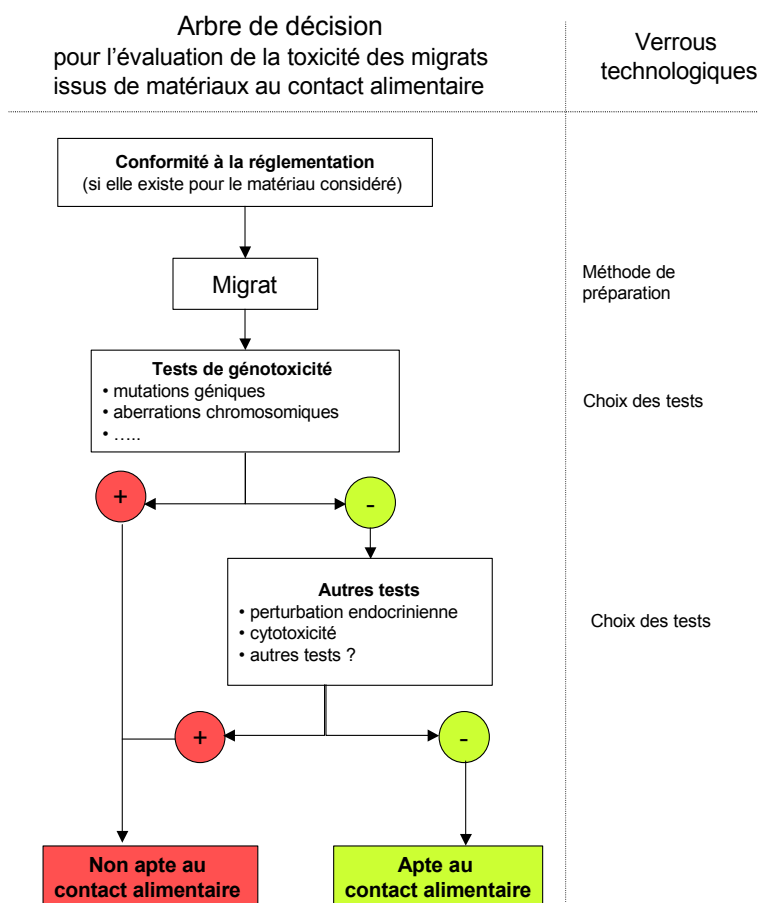
2- Elaboration d'une batterie de tests

Au-delà des difficultés techniques, les points critiques, en terme de toxicologie, devant être évalués comportent prioritairement une batterie de tests de génotoxicité sur les extraits obtenus. Cette batterie de tests comprenant nécessairement un test de mutations géniques et un test d'aberrations chromosomiques.

Si les résultats sont positifs (l'extrait est génotoxique), le matériau serait alors rejeté et considéré comme inapte au contact des denrées alimentaires.

Si les résultats sont négatifs, d'autres tests pourraient être envisagés, en cohérence avec les démarches réglementaires existantes.

Il est proposé à titre d'exemple les tests de cytotoxicité et la mesure du potentiel de perturbation endocrinienne.



ANNEXE 2

LISTE DES PARTICIPANTS

Président du groupe de réflexion

M. Henri HOELLINGER

Experts spécialisés membres CES MCDA

Mme Anne-Christine MACHEREY

M. Dominique LAFON (Vice-président du CES MCDA)

M. Jean-François REGNIER

M. Daniel RIBERA

Coordinateurs Afssa

Mme Nathalie ARNICH (Unité d'évaluation des risques physico-chimiques)

M. Eric BARTHELEMY (Secrétaire scientifique du CES MCDA, Unité d'évaluation des risques physico-chimiques)

Les membres du groupe de réflexion et le président du CES MCDA remercient le Professeur Jean-Claude LHUGUENOT, (ENSBANA, Université de Dijon), Monsieur Bruneau BRET (Club MCAS, Matériaux pour contact alimentaire et santé) et le Docteur François RICHEUX (Phycher Bio-Développement), d'avoir accepté de contribuer à leurs travaux, par leurs présentations et suggestions.

ANNEXE 3 GLOSSAIRE

BADGE	2,2-Bis(4-hydroxyphényl)propane bis (2,3-époxypropyl) Ether
BFDGE	Bis[4 - (glycidyl)oxy - phenyl]methane
BIOSAFE PAPER	Programme Européen ayant pour but le développement, la validation et la normalisation d'une batterie de tests <i>in vitro</i> pour l'évaluation de l'innocuité des papiers et cartons au contact des denrées alimentaires
CES	Comité d'Experts Spécialisé
Clastogène	Qui peut altérer la structure des chromosomes, notamment par rupture de celui-ci en plusieurs segments
EDSTAC	Endocrine Disrupter's Screening and Testing Advisory Committee, [groupe de travail de l'US EPA]
EDTA	Acide éthylènediaminetétracétique
EPA	US Environmental Protection Agency
HDPE	Polyéthylène haute densité ; [High Density Polyethylene]
JOCE	Journal Officiel de la Communauté Européenne
LLDPE	Polyéthylène basse densité [Linear Low Density Polyethylene]
LMS	Limite de Migration Spécifique
MCDA	Matériaux au Contact des Denrées Alimentaires
MTT	Methyl Triazol Tetrazolium, colorant révélateur de la viabilité cellulaire. Réduit par les enzymes cellulaires, il donne un composé qui absorbe spécifiquement à 540 nm.
Néoformés	Produits se formant à l'intérieur de la matrice ou dans l'aliment soit durant le procédé de fabrication de l'emballage, soit lors du conditionnement, ou encore pendant la durée de stockage
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
PA	Polyamides
PET	Poly(téréphtalate d'éthylène) ; [Poly(ethylene terephtalate)]
PE/VA	Poly(éthylène/vinyl acétate)
PP	Polypropylène
PS	Polystyrène
PVC	Chlorure de polyvinyle [Poly(vinyl chloride)]