

Avis de l'Anses relatif à l'évaluation du risque de la fraction nanométrique de l'additif alimentaire E171

Fabrice Nesslany, Emmanuel Flahaut, Anna Bencsik, Marie Carrière, Patrick Chaskiel, Laurent Devoille, Fernand Doridot, Valérie Fessard, Eric Houdeau, Olivier Joubert, et al.

▶ **To cite this version:**

Fabrice Nesslany, Emmanuel Flahaut, Anna Bencsik, Marie Carrière, Patrick Chaskiel, et al.. Avis de l'Anses relatif à l'évaluation du risque de la fraction nanométrique de l'additif alimentaire E171. Saisine n°2016-SA-0226, Anses. 2022, 115 p. anses-04082191

HAL Id: anses-04082191

https://anses.hal.science/anses-04082191

Submitted on 18 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Avis de l'Anses
Saisine n° 2016-SA-0226
Saisines liées n°2017-SA-0020 et 2019-SA-0036

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 27 octobre 2022

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

relatif à l'évaluation du risque de la fraction nanométrique 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.

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél +33 (0)1 49 77 13 50 — www.anses.fr

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

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Contexte

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

Les nanomatériaux ne s'inscrivent pas dans une réglementation spécifique, mais sont régis par diverses réglementations sectorielles déjà existantes (CE n°258/97[1], UE n°1169/2011[2], UE n°10/2011[3], *etc*.). La question de l'harmonisation sur le plan réglementaire fait partie des enjeux et préoccupations soulevés par des organisations de la société civile, principalement des organisations non gouvernementales (ONG), quant aux nanomatériaux en général et dans l'alimentation en particulier.

La coexistence de définitions hétérogènes d'un nanomatériau au sein de ces réglementations sectorielles contribue à entretenir des confusions, notamment par l'interprétation des différents termes employés. Dans ce contexte, le groupe de travail (GT) de l'Anses « nano et alimentation » a établi, dans le cadre de son expertise, une qualification du terme « nanomatériau manufacturé » (Anses 2020) afin de préciser le champ de l'analyse. En préambule et dans l'optique de faciliter la lecture de l'avis, des précisions sont apportées par le groupe de travail dans l'encadré ci-dessous.

Dans le cadre de cette saisine, la notion de production intentionnelle fait référence à une production délibérée de particules de taille nanométrique du nanomatériau manufacturé (voir qualification partie 3.1 de l'avis Anses 2020). La notion de production non intentionnelle fait référence à une production non souhaitée de particules de taille nanométrique du nanomatériau manufacturé.

Le groupe de travail emploie le terme « d'adjonction volontaire » lorsqu'une substance contenant ou susceptible de contenir des nanomatériaux manufacturés (voir qualification

[1] Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires.
[2] Règlement (UE) n°1169/2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires.
[3] Règlement (UE) n°10/2011 de la Commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.

partie 3.1 de l'avis Anses 2021) est ajoutée volontairement et a pour objectif technologique de se retrouver dans les denrées alimentaires. Il emploie le terme d'adjonction involontaire lorsque la présence d'une substance contenant ou susceptible de contenir des nanomatériaux manufacturés n'a pas pour objectif technologique de se retrouver dans les denrées alimentaires.

Le dioxyde de titane est un additif alimentaire qui a été utilisé comme colorant dans différents produits alimentaires. En Europe, la production de denrées alimentaires contenant du dioxyde de titane est interdite depuis le 7 août 2022.

Les débats et changements institutionnels et industriels associés à l'usage du dioxyde de titane se sont accentués depuis 2016 (Anses 2020). Ils existent à l'échelle française comme européenne.

En France, en 2019, la mise sur le marché de produits alimentaires contenant du TiO_2 a été suspendue pour un an par arrêté, la DGCCRF étant chargée du suivi de l'exécution de cet arrêté. Effective le 1er janvier 2020 et adossée au principe de précaution, cette suspension a, depuis cette date, été renouvelée chaque année.

Cette décision fait suite à une lignée de mobilisations associatives et à la publication de l'avis de l'Anses d'avril 2019, rappelant les incertitudes quant aux effets sanitaires de cet additif alimentaire. L'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) avait réagi à cette publication, considérant que les incertitudes soulevées par les travaux de l'Anses étaient déjà celles que l'EFSA avait identifiées et que les résultats ne remettaient pas en question ses conclusions quant à la sûreté de cet additif (EFSA 2019).

La décision française de suspension a eu des conséquences nombreuses en termes politiques et économiques à l'échelle européenne, alors que le dioxyde de titane utilisé comme additif alimentaire disposait d'une autorisation de mise sur le marché délivrée à l'échelle de l'Union européenne (UE).

Cette décision impliquait notamment des changements industriels. Dans la lignée de transformations déjà opérées par différents groupes agro-alimentaires, 90% des entreprises du secteur de la confiserie avaient déjà stoppé par anticipation l'usage du dioxyde de titane en avril 2019[4]. Dans le même temps, la décision française de suspension a suscité l'opposition des industries productrices de dioxyde de titane, mais également cosmétiques et pharmaceutiques, défendant leurs intérêts auprès de la Commission européenne (CE). Ainsi, les producteurs de dioxyde de titane ont rapidement contesté la décision française en lui opposant les avis de l'EFSA notamment celui rendu en 2018 et en soulignant l'absence d'effets sanitaires après ingestion de E171. Un autre argument opposé par ces producteurs tient dans la complexification et la fragmentation du marché issues de la situation particulière de la France par rapport au reste de l'Europe si la seconde ne suivait pas la décision de la première. Cette exception française conduirait selon ces industriels à revoir des compositions dont le

[4] https://www.usinenouvelle.com/article/comment-mentos-a-dit-ciao-au-dioxyde-de-titane.N919079

coût serait principalement supporté par des petites et moyennes entreprises[5]. Deux représentations du problème du dioxyde de titane s'affrontent ainsi : une vision sanitaire d'un côté, une vision économique de l'autre. La décision française adossée au principe de précaution visant la protection de la santé publique s'oppose au principe européen de libre circulation des biens et marchandises dans le cadre du marché unique[6].

En parallèle, dès l'été 2019, des ONG françaises et européennes ont demandé à la CE de retenir et d'élargir la décision française à l'UE[7].

A l'automne 2020, le Parlement européen a adopté une résolution appelant la Commission à retirer le dioxyde de titane de la liste des additifs alimentaires autorisés[8]. Cette résolution parlementaire européenne évoque les dernières connaissances scientifiques disponibles (issues de l'Anses, de l'EFSA mais également du CIRC et du National Institute for Occupational Safety and Health, établissant le caractère cancérogène probable du E171) ; elle invoque également le principe de précaution et l'inutilité nutritionnelle et technologique du E171. Cette résolution parlementaire européenne rappelle également la possibilité des entreprises à se conformer à la décision de suspension française. Elle a été prise alors que la Commission venait de présenter un projet de règlement maintenant le dioxyde de titane sur le marché des additifs alimentaires. Ce projet intégrait les actualisations des données de l'EFSA de 2019 et instituait, dans le cadre de la recommandation de définition des nanomatériaux, un seuil de particules à l'état nanoparticulaire, ce qu'une ONG comme Foodwatch a pu dénoncer[9].

Finalement en mai 2021, l'EFSA a publié un avis estimant que l'emploi du dioxyde de titane ne peut plus être considéré comme sûr en tant qu'additif alimentaire, notamment parce que des effets génotoxiques ne peuvent être exclus (EFSA 2021). En conséquence, la Commission européenne a interdit le dioxyde de titane dans les denrées alimentaires[10].

Dans le même temps, l'E171 reste pour le moment autorisé dans des produits cosmétiques ou d'hygiène, seule l'obligation d'étiquetage nano y prévaut quoique son application puisse être limitée[11]. Cette situation conduit les associations impliquées à prolonger leur mobilisation[12]. L'E171 est également autorisé dans les médicaments, néanmoins l'Agence européenne des médicaments (EMA) doit d'ici 2024 réévaluer les risques du dioxyde de titane,

[5]https://actu.fr/societe/dioxyde-titane-ladditif-e171-interdit-dans-lalimentation-lindustrie-sy-prepare-deja_23024544.html

[6] https://www.euractiv.fr/section/sante-modes-de-vie/opinion/linterdiction-des-bonbons-au-dioxyde-de-titane-doit-prevaloir/

[7] https://www.foodwatch.org/fr/actualites/2021/dioxyde-de-titane-leurope-suit-enfin-la-france-vers-linterdiction-de-cet-additif/

[8] Résolution du Parlement européen du 8 octobre 2020 sur le projet de règlement de la Commission modifiant l'annexe du règlement (UE) nº 231/2012 établissant les spécifications des additifs alimentaires énumérés aux annexes II et III du règlement (CE) nº 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les spécifications du dioxyde de titane (E171) (D066794/04 – 2020/2795(RPS))

[9] Dioxyde de titane dans l'alimentation : le débat s'ouvre au niveau européen (actu-environnement.com)

[10] Règlement CE n° 2022/63.

[11] Résolution du Parlement européen du 8 octobre 2020, *op.cit.*

[12]https://dentifrice-infoconso.agirpourlenvironnement.org/ ; https://veillenanos.fr/dossier/gouvernance/reglementations-nano/suspension-elargie-tio2/

en vue d'une nouvelle décision de la Commission européenne relative au maintien ou à l'exclusion de cette substance de la liste des substances autorisées pour les médicaments[13].

Bien que l'usage du E171 soit interdit en Europe depuis le 7 août 2022, le troisième volet de cette saisine vise à approfondir les connaissances scientifiques sur les effets sanitaires relatifs à la fraction nanométrique du E171.

Objet de la saisine et périmètre d'étude

Le groupe de travail « nano et alimentation » a été constitué afin de répondre aux demandes suivantes :

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

Dans l'optique de répondre à ces demandes, l'Anses a mis en place une expertise séquentielle dont les conclusions et recommandations ont conduit à la publication de différents avis.

En 2020, l'Anses a publié un premier avis intégrant les conclusions et recommandations relatives à: (i) la réalisation d'une étude détaillée de la filière agroalimentaire et (ii) l'analyse des critiques/contestations relatives à la présence des nanomatériaux dans l'alimentation et des différentes dimensions qu'elles soulèvent (scientifiques, réglementaires, économiques, sociétales).

Dans un deuxième avis publié en 2021, l'Anses a proposé un guide scientifique et technique décrivant la méthodologie à mettre en place dans le cadre de l'évaluation du risque de la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés utilisés en tant qu'additifs alimentaires. La méthodologie ainsi proposée par l'Anses est séquentielle et se décline en 4 étapes majeures : 1) identification des nanomatériaux, 2) caractérisation de la dissolution des nanomatériaux, 3) calcul des expositions et identification des dangers, 4) caractérisation du risque.

Le présent avis est une mise en application de la méthodologie d'évaluation du risque « nanospécifique » pour le dioxyde de titane utilisé en tant qu'additif alimentaire (E171). Dans cette optique, l'Anses a mis à jour les données relatives à la caractérisation physico-chimique du E171, à ses propriétés de dissolution, aux niveaux d'exposition alimentaire des consommateurs français et à la toxicité de la fraction nanométrique du E171.

[13] https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/E-9-2022-000066-ASW_EN.html

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

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

L'Anses a confié au groupe de travail « nano et alimentation », rattaché au comité d'experts spécialisés « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA), l'instruction de cette 3ème partie de la saisine.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis régulièrement au CES ERCA ainsi qu'au CES « Evaluation des risques liés aux agents physiques et nouvelles technologies » (CES AP) entre septembre 2017 et juillet 2022.

Les conclusions du groupe de travail ont été validées par le CES ERCA le 5 juillet 2022.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GROUPE DE TRAVAIL NANO ET ALIMENTATION ET DU COMITE D'EXPERTS SPECIALISES ERCA

3.1. Identification de l'additif alimentaire E171

L'additif alimentaire E171 est constitué de particules de dioxyde de titane (TiO_2, numéro CAS: 13463-67-7). Le TiO_2 est une substance inorganique présente sous deux formes cristallines (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.

Le TiO_2 est principalement fabriqué à partir d'ilménite (oxyde de fer et de titane $FeTiO_3$) ou de rutile naturelles. Ces deux matériaux de départ sont convertis en TiO_2 selon 2 approches différentes : l'extraction via les sulfates ou les chlorures. Cette dernière approche est plus largement utilisée pour des raisons économiques et environnementales.

Les données de la littérature indiquent une grande variabilité concernant la distribution en taille des particules des différents lots de E171 présents dans le commerce (Anses 2019 ; EFSA 2016, EFSA 2021). 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 (particules constitutives présentant au moins une dimension comprise entre 1 et 100 nm (nano-échelle)) varie, selon les données de la littérature, de 5 à 74% en nombre et de 0,5 à 33% en masse (voir section 3.3.3.1 ; Verleysen *et al.* 2020; EFSA 2016, EFSA 2021).

Les observations en microscopie électronique indiquent que la plus petite taille de particule de TiO_2 mesurée est de 10 nm. La fraction nanométrique du E171 couvre la gamme de taille 10-100 nm.

L'additif alimentaire E171 a largement été utilisé comme colorant alimentaire, les niveaux maximaux d'incorporation sont définis par le règlement (CE) n°1333/2008 relatif aux additifs alimentaires. Le E171 a été autorisé en *quantum satis*[14] dans 51 catégories alimentaires jusqu'en 2016 (EFSA 2016) puis dans 48 catégories alimentaires jusqu'en 2021 (EFSA 2021). L'emploi du TiO_2 en tant qu'additif alimentaire (E171) a été suspendu en France le 1er janvier 2020 puis interdit en Europe à partir d'août 2022.

3.2. Caractérisation de la dissolution de l'additif alimentaire E171

Afin de déterminer la méthodologie d'évaluation du risque à mettre en place (approche standard ou nano-spécifique), l'Anses a intégré dans son guide technique (Anses 2021) une étape relative à la caractérisation de la dissolution des nanomatériaux. En effet, dans le cas où les nanomatériaux seraient totalement dissous (sous forme ionique dans le cas du TiO_2), une évaluation du risque standard serait mise en place. En absence de dissolution ou dans le cas d'une dissolution partielle (cohabitation des formes particulaires et ioniques), l'évaluation du risque suivrait une approche nanospécifique. Dans cette optique, la stratégie expérimentale proposée par le GT consiste à mettre en suspension les nanomatériaux dans des milieux aqueux à deux pH différents, l'un simulant un environnement gastrique à jeun (pH = 1, milieu le plus acide rencontré dans l'estomac) et l'autre un environnement intestinal (pH = 7, milieu de pH le plus élevé rencontré dans l'intestin), à 37°C pendant 2h. L'observation de nanoparticules résiduelles par microscopie électronique (balayage ou transmission) après 2h d'incubation à pH 1 et pH 7 est un critère justifiant la mise en place d'une évaluation du risque nanospécifique.

Le GT a identifié 3 publications s'intéressant à la dissolution du TiO_2 dans le contexte de l'exposition par voie orale (Avramescu *et al.* 2017; Jo *et al.* 2016 ; Sohal *et al.* 2018). L'analyse méthodologique de ces publications indique que l'étude de la dissolution des nanomatériaux dans un milieu mimant les conditions du tractus gastro-intestinal se déroule généralement à deux pH (conditions gastrique et intestinale), à la température de 37°C et pour une durée de 2h. La composition de ces milieux en composés inorganiques (présence de sels) et organiques (présence de protéines et d'enzymes telles que la pepsine ou la pancréatine) est variable selon les études. Il est à noter que les conditions physico-chimiques du milieu dispersant sont connues pour moduler la solubilité des nanomatériaux. La méthode communément employée pour déterminer les niveaux de dissolution repose sur une étape préalable de centrifugation et/ou de filtration permettant d'isoler les particules résiduelles. Les surnageants et/ou filtrats sont collectés afin de quantifier les formes dissoutes selon une analyse élémentaire par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICPMS ou ICPOES).

Dans l'étude de Jo *et al.* (2016), la solubilité de 2 types de TiO_2 a été évaluée *in vitro* et *in vivo*. Le premier est un TiO_2 de qualité alimentaire (f-TiO_2) avec une taille moyenne de particules primaires de 117 ± 41 nm et le second un TiO_2 de qualité « *générale* » (g-TiO_2) dont la taille moyenne des particules primaires est légèrement plus élevée (153 ± 49 nm), et présentant des tailles d'agglomérats plus importantes (543 nm contre 438 nm pour le f-TiO_2). Pour les

[14] 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.

conditions d'essai *in vitro*, un simulant du fluide gastrique à pH 1,5 (0,2% NaCl, 0,32% pepsine) et un tampon phosphate à pH 7,4 ont été utilisés. Les niveaux de dissolution à pH 1,5 mesurés par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) pour une concentration initiale en TiO_2 de 5 mg/mL sont de 0,06% ± 0,03% pour le f-TiO_2 et 0,05% ± 0,03% pour le g-TiO_2. Les résultats de dissolution à pH 7,4 ne sont pas indiqués. Pour les conditions d'essai *in vivo*, une dose de 500 mg/kg de poids corporel (pc) a été administrée à des rats mâles par voie orale,15 minutes après l'administration, les fluides gastriques ont été prélevés pour analyse. Les niveaux de dissolution sont de 0,05% ± 0,03% pour le f-TiO_2 et de 0,08% ± 0,05% pour le g-TiO_2. Ces résultats indiquent que les niveaux de dissolution du TiO_2 sont inférieurs à 0,1% pour les deux types de TiO_2 étudiés, *in vitro* et *in vivo*.

Dans l'étude de Sohal *et al.* (2018), les auteurs ont étudié la cinétique de dissolution et le comportement d'un TiO_2 de type anatase (A200 qualifié par le fournisseur comme étant de qualité alimentaire et présentant des tailles de particules primaires de 100-150 nm), dans des simulants salivaire (pH 6,5), gastrique (pH 1,4) et intestinal (pH 8,1) puis dans un modèle mimant la cascade de digestion séquentielle bucco-gastro-intestinale intégrant des temps de séjour variables dans chacun des compartiments. 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 TiO_2 a ensuite diminué (500 nm) lors du transfert à la phase intestinale, puis a augmenté (~900 nm) à la fin de cette phase. Dans cette étude, la concentration dissoute fluctue autour de 0,1 µM avec un maximum à 4 µM au tout début de la phase intestinale (soit une proportion de 0,42% du matériau de départ) avec des concentrations initiales en TiO_2 variant de 0,04 à 0,2 mg/mL.

Dans l'étude d'Avramescu *et al.* (2017), la dissolution de 2 formes cristallines de TiO_2, l'une anatase (taille des particules < 25 nm), l'autre rutile (taille des particules < 100 nm), a été suivie pendant 2h à pH 1,5 et pH 7 à 37°C avec une concentration initiale en TiO_2 de 0,5 mg/mL. A pH acide, la forme anatase présente des niveaux de dissolution plus importants (0,022 %) que la forme rutile (0,0002 %). A pH neutre, la proportion solubilisée est indépendante de la forme cristalline et s'élève à 0,00007 %). Cet effet est en revanche à relativiser au regard des SSA (specific surface area) différentes des deux formes : 154 m²/g pour la forme anatase contre 18 m^2/g pour la forme rutile. Enfin, aucune différence significative n'est observée sur les niveaux de solubilité selon la taille des particules à phase cristalline identique (nano vs non nano (5 µm)).

Une preuve complémentaire de la faible solubilité du TiO_2 tout au long du tractus gastro-intestinal est donnée par les conditions drastiques nécessaires pour la préparation d'échantillons pour le dosage du Ti afin de garantir une dissolution totale (étape dite de minéralisation) : H_2O_2 + NH_4OH pour la phase rutile et H_2SO_4 + HF pour la phase anatase, la solubilisation étant souvent réalisée à température élevée (O'Neil 2013 ; Apopei *et al.*, 2018).

Si les informations issues de l'analyse de la littérature semblent indiquer que le TiO_2 présente une faible solubilité dans des conditions de pH mimant celles du tractus gastro-intestinal, le GT relève plusieurs limitations. A titre d'exemple dans la publication de Sohal *et al.* (2018), les auteurs ont utilisé un TiO_2 de type anatase référencé sous le code A200. Selon le fournisseur, cette substance présenterait des propriétés semblables au TiO_2 de qualité alimentaire. Cependant, le manque d'informations relatives à l'identification du A200, notamment concernant la distribution en taille ou la surface spécifique, ainsi que le manque d'information

relative aux usages de cette substance ne permet pas d'affirmer qu'elle s'apparente au E171 en termes de caractéristiques physico-chimiques, de comportement et d'effet sur la santé. De plus, le GT souligne que la microscopie électronique n'est pas systématiquement utilisée post solubilisation pour l'observation des particules primaires résiduelles. Parmi les études résumées ci-dessus, l'étude de Sohal *et al.* (2018) est la seule reposant sur de la microscopie électronique dans le but d'évaluer les modifications morphologiques et l'état d'agglomération des particules post-solubilisation. Le GT souligne que ces observations n'ont pas été couplées à la spectrométrie à dispersion d'énergie (EDX). En effet, dans son avis publié en 2020, l'Anses préconise que l'observation au microscope électronique soit systématiquement couplée à l'EDX afin de caractériser la composition chimique du nanomatériau étudié et donc d'exclure les éventuels artéfacts.

Des travaux sont actuellement en cours à l'OCDE dans l'optique de développer des méthodes harmonisées pour la mesure de la solubilité des nanomatériaux en milieu aqueux et dans des milieux biologiques pertinents dans le cadre d'une évaluation du risque.

3.3. Calculs d'exposition des consommateurs à l'additif alimentaire E171 et à sa fraction nanométrique

3.3.1. Détermination de la concentration en E171 par catégorie alimentaire

3.3.1.1. Méthodologie

Les niveaux de concentrations en TiO_2 dans différents produits alimentaires ont été collectés à travers une recherche bibliographique reposant sur deux bases de données : PubMed et Scopus. Des données additionnelles provenant d'agences nationales ou européennes (RIVM, EFSA), de la littérature grise (données publiées par des ONG) et des contrôles menés par la DGCCRF ont également été considérées. A l'issue de cette recherche, deux sources d'information ont été considérées :

- les niveaux d'usages du E171 rapportés par l'industrie (publiés par l'EFSA 2016 et le RIVM (Sprong *et al.* 2015)). A partir d'une base de données intégrant 194 niveaux d'usages couvrant 16 catégories alimentaires, des valeurs de concentrations en TiO_2 minimales, moyennes et maximales ont été déterminées par le GT pour chaque catégorie alimentaire lorsque les données étaient disponibles. Du fait de la disparité du nombre de données selon la source, les concentrations moyennes par catégorie alimentaire ont été calculées par pondération[15]. Pour les données minimales et

[15] Du fait de l'hétérogénéité du nombre de données industrielles provenant de l'EFSA et du RIVM, le GT a déterminé une moyenne pondérée des concentrations en E171 par catégorie alimentaire lorsque des données industrielles et analytiques étaient disponibles.

$$[E171]_{\text{catégorie alimentaire}} = (x[E171]_{EFSA} + y[E171]_{RIVM}) / (x+y)$$

Avec $[E171]_{\text{catégorie alimentaire}}$ la concentration moyenne de E171 par catégorie alimentaire, x le nombre de données industrielles provenant de l'EFSA, y le nombre de données industrielles provenant du RIVM et $[E171]_{EFSA}$ et $[E171]_{RIVM}$ les concentrations moyennes issues des données industrielles provenant de l'EFSA et du RIVM.

maximales, les valeurs les plus basses et les plus hautes ont été choisies indépendamment de la source.

- les données analytiques provenant de l'analyse de produits alimentaires. Une base de données intégrant 332 niveaux de concentration (issus de l'analyse de 292 produits alimentaires) couvrant 29 catégories alimentaires a été élaborée par le GT. Ces données sont issues de la littérature scientifique (en majorité), des contrôles de la DGCCRF (18 données) ainsi que des mesures publiées par des ONG (11 données). Chacun des produits alimentaires a été classé dans l'une des catégories alimentaires selon le descriptif proposé par la Commission européenne[16]. Des concentrations minimales, moyennes et maximales en TiO_2 ont été déterminées pour chacune de ces catégories alimentaires.

Les produits alimentaires considérés dans cette étude proviennent de différents marchés (Europe, Chine, Etats-Unis, Australie, Jordanie, Corée). Le GT ne s'est pas limité aux données issues des produits alimentaires fabriqués exclusivement en Europe car 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.

Concernant les données analytiques (issues de la recherche bibliographique), le GT a mis en place les méthodologies suivantes : dans le cas où le E171 n'est pas détecté (valeur < LOD) ou ne peut être quantifié (valeur < LOQ) au sein des matrices alimentaires, le GT a décidé d'assigner respectivement, comme niveau de concentration en E171, la valeur de la LOD ou de la LOQ de la technique utilisée pour la mesure (approche dite « upper bound », cela correspond à 37 données sur les 332). 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 (cela correspond à 1 donnée analytique sur les 332).

Le GT a décidé d'inclure également, pour les calculs d'exposition, les catégories alimentaires pour lesquelles l'usage du E171 n'est pas autorisé mais présentant des teneurs en TiO_2 détectées suite aux analyses des produits alimentaires (voir discussions dans la section incertitudes). En effet, la prise en compte de ces denrées reflète une réalité de marché et l'exclusion de ces catégories pourrait conduire à une sous-estimation de l'exposition des consommateurs au E171.

3.3.1.2. Résultats

Les concentrations en E171 dans les différentes catégories alimentaires, calculées à partir des données d'usages rapportées par l'industrie et des données analytiques, sont présentées dans le Tableau 1. Les données d'occurrence pour 33 catégories alimentaires ont pu être renseignées. Parmi ces 33 catégories alimentaires, 8 catégories alimentaires (en gris dans le Tableau 1) contiennent du TiO_2 alors que l'usage du E171 n'y est pas autorisé. Pour ces 8

[16] Guidance document describing the food categories in Part E of Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 on Food Additives

catégories alimentaires, la présence de TiO_2 peut s'expliquer par le phénomène de « carry over[17] » ou de limitations méthodologiques (voir partie suivante).

Sur la base du recensement effectué, les plus fortes concentrations en E171 sont retrouvées dans les confiseries (21 940 mg/kg), les succédanés de produits laitiers (7 820 mg/kg), les produits de boulangerie fine (4 037 mg/kg), les sauces (7 270 mg/kg) et également dans les compléments alimentaires dans lesquels la concentration maximale a été mesurée (26 950 mg/kg). Les niveaux de concentration dans les compléments alimentaires sont présentés à titre d'information, cependant ils n'ont pas été considérés dans les calculs d'exposition car ce type d'usage ne rentre pas dans le cadrage de cette saisine (voir introduction).

Le GT précise que les niveaux de concentration relatifs aux confiseries ont été collectés avant le retrait du E171 initié en 2018 par les industriels.

Tableau 1. Concentrations de l'additif alimentaire E171 en mg/kg ou mg/L par catégorie alimentaire (selon la catégorisation FCS (food categorisation system)) pour lesquelles les données d'occurrence étaient disponibles

Min, Moy et Maxi correspondent respectivement aux concentrations minimales, moyennes et maximales. 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.

* une unique donnée de concentration est disponible

** la valeur minimale n'est pas indiquée (EFSA 2016)

Numéro FCS	Catégorie alimentaire	Nombre de données	Niveaux d'usage (industrie) ou données analytiques (mg/kg ou mg/L)			Type de données	Source
			Min.	Moy.	Maxi.		
01.4	Produits laitiers fermentés aromatisés, y compris traités thermiquement	1		48*		Industrie	Sprong 2016
01.6.3	Autres crèmes	1		1,2*		Données analytiques	Weir 2012
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	Lomer 2000 ; Weir 2012
01.7.5	Fromages fondus	8	0,4	2,3	11,5	Données analytiques	Weir 2012
01.8	Succédanés de produits laitiers, y compris blanchisseurs de boissons	2	125	2563	5000	Industrie	EFSA 2016 ; Sprong 2016
		11	10	1590	7820	Données analytiques	Lomer 2000 ; Weir 2012 ; Rompelberg 2016 ; López-Heras 2014 ; Lim 2018
03	Glaces de consommation	23	1	398	1902	Industrie	EFSA 2016 ; Sprong 2016
		2	0,1	0,2	0,4	Données analytiques	Rompelberg 2016

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

Numéro FCS	Catégorie alimentaire	Nombre de données	Niveaux d'usage (industrie) ou données analytiques (mg/kg ou mg/L)			Type de données	Source
			Min.	Moy.	Maxi.		
04.2.4.1	Préparations de fruits et de légumes, à l'exclusion des compotes	2	0,3	0,3	0,3	Données analytiques	Rompelberg 2016
05.2	Autres confiseries, y compris les microconfiseries destinées à rafraîchir l'haleine	15	9,5	911	4500	Industrie	EFSA 2016 ; Sprong 2016
		51	0,3	985	21940	Données analytiques	Lomer 2000 ; Weir 2012 ; Kim 2018 ; Sharif 2015 ; de la Calle 2018 ; Lim 2018 ; Reed 2015 ; DGCCRF 2017
05.3	Chewing-gum	56	100	3563	16000	Industrie	EFSA 2016 ; Sprong 2016
		37	0,3	2475	12100	Données analytiques	Fiordaliso 2018 ; Lomer 2000 ; Weir 2012 ; Kim 2018 ; Sharif 2015 ; Chen 2013 ; Dudefoi 2018 ; Rompelberg 2016 ; Reed 2015 ; APE 2016
05.4	Décorations, enrobages et fourrages, à l'exclusion des fourrages à base de fruits relevant de la catégorie 4.2.4	27	0,1	728	20000	Industrie	EFSA 2016 ; Sprong 2016
		7	1,1	2291	5988	Données analytiques	Lomer 2000 ; Weir 2012 ; López-Heras 2014 ; Reed 2015
06.3	Céréales pour petit-déjeuner	2	2,0	2,1	2,2	Données analytiques	Weir 2012
06.7	Céréales précuites ou transformées	1		3,5*		Données analytiques	Weir 2012
07.2	Produits de boulangerie fine	5	76	754	2338	Industrie	EFSA 2016 ; Sprong 2016
		22	0,3	608	4037	Données analytiques	Lomer 2000 ; Weir 2012 ; Rompelberg 2016 ; Lim 2018 ; DGCCRF 2017, APE 2018
08.3.3	Boyaux, enrobages et décorations pour viande	2	**	18	35	Industrie	EFSA 2016
09.2	Poisson et produits de la pêche transformés, y compris mollusques et crustacés	40	0,4	6,8	135	Données analytiques	Yin 2017 ; Taboada-Lopez 2019
12.4	Moutarde	1		0,3*		Données analytiques	Lomer 2000
12.5	Soupes, potages et bouillons	1		193*		Industrie	EFSA 2016
12.6	Sauces	24	500	1514	4000	Industrie	EFSA 2016 ; Sprong 2016
		16	0,3	1360	7270	Données analytiques	Lomer 2000 ; Weir 2012 ; Rompelberg 2016 ; Reed 2015 ; APE 2018

Numéro FCS	Catégorie alimentaire	Nombre de données	Niveaux d'usage (industrie) ou données analytiques (mg/kg ou mg/L)			Type de données	Source
			Min.	Moy.	Maxi.		
12.7	Salades et pâtes à tartiner salées	7	83	83	83	Données analytiques	Sharif 2015
		2		2500	3000	Industrie	EFSA 2016
12.9	Produits protéiques, à l'exclusion des produits relevant de la catégorie 1.8	5	1700	3040	5000	Industrie	Sprong 2016
14.1.4	Boissons aromatisées	6	**	28	70	Industrie	EFSA 2016
		29	0,1	877	8320	Données analytiques	Weir 2012 ; Sharif 2015 ; Rompelberg 2016 ; Lim 2018
15.1	Amuse-gueules à base de pommes de terre, de céréales, de farine, d'amidon ou de fécule	1		2,0*		Données analytiques	Weir 2012
15.2	Fruits à coque transformé	7	500	2398	7000	Industrie	EFSA 2016, Sprong 2016
		2	1920	2460	3000	Données analytiques	Lim 2018
16	Desserts, à l'exclusion des produits relevant des catégories 1, 3 et 4	3	130	153	200	Industrie	EFSA 2016, Sprong 2016
		9	0,2	1779	12500	Données analytiques	Weir 2012 ; Rompelberg 2016 ; DGCCRF 2017
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	EFSA 2016
		28	52	13495	26950	Données analytiques	EFSA 2016 ; Rompelberg 2016
1.1	Lait pasteurisé et stérilisé (y compris par procédé UHT) non aromatisé	10	0,1	44,2	434	Données analytiques	Weir 2012 ; Rompelberg 2016
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	Weir 2012, Sharif 2015 ; Rompelberg 2016
1.7.2	Fromages affinés	2	1,1	1,4	1,7	Données analytiques	Weir 2012
4.2.1	Fruits et légumes séchés	1		11,6*		Données analytiques	Weir 2012
4.2.6	Produits de pommes de terre transformés	1		3,0*		Données analytiques	Weir 2012
5.1	Produits de cacao et de chocolat visés dans la directive 2000/36/EC	19	0,3	503	4620	Données analytiques	Lomer 2000 ; Weir 2012 ; Kim 2018 ; Lim 2018
9.1	Poissons et produits de la pêche non transformés	9	1,7	8,1	20	Données analytiques	Yin 2017
11.4	Edulcorants de table	2	0,3	0,3	0,3	Données analytiques	Lomer 2000

3.3.2. Calcul d'exposition des consommateurs à l'additif alimentaire E171

3.3.2.1. Méthodologie

Les niveaux d'exposition des consommateurs ont été déterminés à partir de l'outil FAIM[18] (Food Additives Intake Model) proposé par l'EFSA.

L'outil FAIM permet d'estimer l'exposition alimentaire chronique aux additifs alimentaires. Il permet aux pétitionnaires, aux évaluateurs de risque ou aux gestionnaires du risque d'estimer l'exposition moyenne et élevée (95ème centile) aux additifs alimentaires pour différentes classes d'âge dans plusieurs pays européens.

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

Pour calculer les expositions des consommateurs au E171, le GT s'est reposé sur :

- les données de concentrations en E171 dans les différentes catégories alimentaires telles que rapportées dans le Tableau 1 ;
- les niveaux de consommation de la base de données de l'EFSA sur la consommation alimentaire européenne. Dans le cas de la France, les données de consommation sont issues de l'étude INCA 3.

L'exposition des consommateurs est calculée en multipliant, pour chaque catégorie alimentaire, les concentrations en E171 (moyenne ou maximale selon le scénario d'exposition) par les niveaux de consommation de chaque individu référencés dans la base de données. Les expositions calculées pour chacune des catégories alimentaires sont additionnées afin de déterminer une exposition totale journalière pour chaque individu. Ces expositions totales journalières pour chaque individu sont moyennées sur le nombre de jours d'enquête. Cette approche permet d'obtenir des distributions d'expositions totales journalières individuelles et de calculer une valeur moyenne et un 95ème centile d'exposition totale journalière pour chaque classe d'âge considérée.

Ainsi, l'outil FAIM a permis de calculer, dans le cas de la France, les niveaux d'exposition au E171 pour 5 classes d'âges : les enfants (de 1 à 3 ans et de 3 à 9 ans), les adolescents (10 à 17 ans), les adultes (18 à 65 ans) et les personnes âgées (plus de 65 ans).

Pour les calculs d'exposition, deux scenarii ont été considérés par le GT et sont décrits dans le

Tableau 2.

[18] https://www.EFSA.europa.eu/en/applications/foodingredients/tools

Tableau 2. Scenarii d'exposition considérés pour le calcul des niveaux d'exposition à l'additif alimentaire E171

Scénario	Description
1	Sont considérées uniquement les concentrations maximales toutes sources confondues (industrielle et analytique). Les catégories alimentaires pour lesquelles l'usage du E171 n'est pas autorisé sont également considérées dans les calculs d'exposition.
2	Sont considérées uniquement les valeurs moyennes pondérées[19] issues des données industrielles et analytiques. Les catégories alimentaires pour lesquelles l'usage du E171 n'est pas autorisé sont également considérées dans les calculs d'exposition.

Parmi les données analytiques issues de la littérature, le GT a relevé la présence de TiO_2 au sein de catégories alimentaires pour lesquelles l'emploi du E171 n'est pas autorisé (hypothèse du « carry over[17] », voir section 3.3.5). Afin de déterminer les niveaux d'exposition les plus réalistes possibles, le GT a donc considéré les catégories alimentaires pour lesquelles l'emploi du E171 est autorisé (avant son interdiction en août 2022) ainsi que celles pour lesquelles son emploi n'est pas autorisé par soucis de mieux refléter la réalité du marché.

3.3.2.2. Résultats

Les niveaux d'exposition pour les enfants, les adolescents, les adultes et les personnes âgées sont indiqués dans le Tableau 3. Le GT précise que les données de consommation pour les enfants de 0 à 1 an sont disponibles dans l'étude Inca 3. Cependant, le GT n'a pas été en mesure de collecter des données de concentrations en E171 dans les aliments infantiles, principales denrées alimentaires consommées par cette classe d'âge. Dans ce contexte, le GT n'a pas déterminé les niveaux d'exposition pour les enfants de 0 à 1 an. La diversification alimentaire étant plus importante pour les enfants de 1 à 3 ans, les niveaux d'exposition ont été déterminés pour cette classe d'âge.

[19] Du fait de l'hétérogénéité du nombre de données provenant de l'industrie et des mesures analytiques, le GT a déterminé une moyenne pondérée des concentrations en E171 par catégorie alimentaire lorsque des données industrielles et analytiques étaient disponibles.

$$[E171]_{\text{catégorie alimentaire}} = (x[E171]_{\text{analytique}} + y[E171]_{\text{industrielle}}) / (x+y)$$

Avec $[E171]_{\text{catégorie alimentaire}}$ la concentration moyenne de E171 par catégorie alimentaire, x le nombre de données analytiques, y le nombre de données industrielles et $[E171]_{\text{analytique}}$ et $[E171]_{\text{industrielle}}$ les concentrations moyennes issues des données analytiques et industrielles.

Tableau 3. Niveaux d'exposition des consommateurs à l'additif alimentaire E171 en fonction de la classe d'âge

N° du scénario	Description du scénario	Niveau d'exposition au E 171 (mg/kgpc/j)									
		Enfants (1-2 ans)		Enfants (3-9 ans)		Adolescents (10-17 ans)		Adultes (18-65 ans)		Personnes âgées (>65 ans)	
		Moy.	P95	Moy.	P95	Moy.	P95	Moy.	P95	Moy.	P95
1	**Scénario maximaliste**	88,1	280,1	98,5	224,8	50,6	128,6	25,7	75,0	14,5	39,7
2	**Scénario moyen**	11,3	34,1	11,4	24,3	5,8	13,3	3,3	8,5	2,1	4,9
EFSA Opinion 2021	Scénario d'exposition maximaliste	6,0	19,4	8,4	19,1	5,0	12,7	3,1	8,0	2,0	5,7
	Scénario d'exposition affiné – loyauté aux marques	4,9	14,1	6,5	15,7	4,0	10,7	2,6	6,6	1,7	4,7
	Scénario d'exposition affiné – non loyauté aux marques	2,6	7,5	3,2	7,3	1,9	4,4	1,3	3,1	0,9	2,5

Erreur ! Source du renvoi introuvable.A titre de comparaison, les niveaux d'exposition de la population française au E171 déterminés par le panel d'experts de l'EFSA en 2021 sont indiqués en bas du **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**. Dans les deux cas, les niveaux d'exposition ont été déterminés à partir des données de consommation issues d'INCA 3.

Les niveaux d'exposition calculés par le GT pour ces 2 scénarii sont les suivants :

- Pour le scénario 1, considéré comme un scénario du pire cas, l'exposition moyenne au E171 varie de 14,5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 98,5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants de 3 à 9 ans. Au 95ème centile, l'exposition varie de 39,7 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 280,1 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants de 1 à 2 ans.

- Pour le scénario 2, considéré comme étant représentatif de l'exposition moyenne des consommateurs, l'exposition moyenne au E171 varie de 2,1 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 11,4 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants de 3 à 9 ans. Au 95ème centile, l'exposition varie de 4,9 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 34,1 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants de 1 à 2 ans.

Les Tableaux 4 et 5 présentent respectivement les contributions des différentes catégories alimentaires à l'exposition au E171 dans le cas du scénario représentatif de l'exposition moyenne et du scénario du pire cas.

Tableau 4. Contribution des catégories alimentaires à l'exposition des consommateurs dans le cas du scénario moyen en fonction de la classe d'âge.

Les cellules grisées représentent les 5 contributeurs majoritaires pour chaque classe d'âge

Numéro FCS	Catégories alimentaires	Enfants 1-2 ans	Enfants 3-9 ans	Adolescents 10-17 ans	Adultes 18-65 ans	Personnes âgées + de 65 ans
01.1	Lait pasteurisé et lait stérilisé (y compris par procédé UHT) non aromatisés	4,8%	3,8%	3,3%	2,0%	2,8%
01.2	Produits laitiers fermentés non aromatisés, y compris le babeurre naturel non aromatisé (à l'exclusion du babeurre stérilisé), non traités thermiquement après fermentation	0,7%	0,4%	0,4%	0,6%	1,4%
01.4	Produits laitiers fermentés aromatisés, y compris traités thermiquement	1,4%	1,0%	0,7%	0,8%	0,7%
01.6.3	Autres crèmes	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
01.7.1	Fromages non affinés, à l'exclusion des produits relevant de la catégorie 16	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
01.7.2	Fromages affinés	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
01.7.5	Fromages fondus	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
01.8	Succédanés de produits laitiers, y compris blanchisseurs de boissons	11,7%	2,2%	1,5%	5,0%	5,2%
03	Glaces de consommation	0,5%	1,0%	0,9%	0,9%	1,0%
04.2.1	Fruits et légumes séchés	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
04.2.4.1	Préparations de fruits et de légumes, à l'exclusion des compotes	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
04.2.6	Produits de pommes de terre transformés	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
05.1	Produits de cacao et de chocolat visés dans la directive 2000/36/EC	14,2%	9,5%	6,1%	3,0%	2,8%
05.2.1	Autres confiseries avec sucre ajouté	1,9%	2,8%	2,2%	1,6%	1,3%
05.2.2	Autres confiseries sans sucre ajouté	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
05.3.1	Chewing gum avec sucre ajouté	0,0%	0,1%	0,2%	0,1%	0,0%
05.3.2	Chewing gum avec sucre ajouté	0,0%	0,1%	0,2%	0,3%	0,1%
05.4	Décorations, enrobages et fourrages, à l'exclusion des fourrages à base de fruits relevant de la catégorie 4.2.4	0,0%	0,0%	0,1%	0,1%	0,0%
06.3	Céréales pour petit-déjeuner	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
06.7	Céréales précuites ou transformées	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
07.2	Produits de boulangerie fine	15,6%	20,3%	18,7%	18,9%	22,8%

Numéro FCS	Catégories alimentaires	Enfants 1-2 ans	Enfants 3-9 ans	Adolescents 10-17 ans	Adultes 18-65 ans	Personnes âgées + de 65 ans
09.1.1	Poissons non transformés	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,2%
09.1.2	Mollusques et crustacés non transformés	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
09.2	Poisson et produits de la pêche transformés, y compris mollusques et crustacés	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
11.4	Edulcorants de table	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
12.4	Moutarde	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
12.5	Soupes, potages et bouillons	1,4%	1,0%	0,7%	1,4%	3,1%
12.6	Sauces	9,1%	11,6%	15,9%	19,3%	19,3%
12.7	Salades et pâtes à tartiner salées	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
12.9	Produits protéiques, à l'exclusion des produits relevant de la catégorie 1.8	0,0%	0,2%	0,2%	0,7%	0,6%
14.1.4.1	Boissons aromatisées avec sucre	16,9%	28,6%	34,6%	28,7%	17,4%
14.1.4.2	Boissons aromatisées aves edulcorants	2,7%	1,4%	2,0%	2,6%	1,7%
15.1	Amuse-gueules à base de pommes de terre, de céréales, de farine, d'amidon ou de fécule	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
15.2	Fruits à coque transformé	0,5%	0,7%	0,7%	3,2%	4,8%
16	Desserts, à l'exclusion des produits relevant des catégories 1, 3 et 4	18,5%	15,3%	11,4%	10,6%	14,5%

Tableau 5. Contribution des catégories alimentaires à l'exposition des consommateurs dans le cas du scénario maximaliste en fonction de la classe d'âge

Les cellules grisées représentent les 5 contributeurs majoritaires pour chaque classe d'âge.

Numéro FCS	Catégories alimentaires	Enfants 1-2 ans	Enfants 3-9 ans	Adolescents 10-17 ans	Adultes 18-65 ans	Personnes âgées + de 65 ans
01.1	Lait pasteurisé et lait stérilisé (y compris par procédé UHT) non aromatisés	6,1%	4,3%	3,7%	2,5%	3,8%
01.2	Produits laitiers fermentés non aromatisés, y compris le babeurre naturel non aromatisé (à l'exclusion du babeurre stérilisé), non traités thermiquement après fermentation	0,2%	0,1%	0,1%	0,1%	0,3%
01.4	Produits laitiers fermentés aromatisés, y compris traités thermiquement	0,2%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
01.6.3	Autres crèmes	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
01.7.1	Fromages non affinés, à l'exclusion des produits relevant de la catégorie 16	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
01.7.2	Fromages affinés	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
01.7.5	Fromages fondus	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Numéro FCS	Catégories alimentaires	Enfants 1-2 ans	Enfants 3-9 ans	Adolescents 10-17 ans	Adultes 18-65 ans	Personnes âgées + de 65 ans
01.8	Succédanés de produits laitiers, y compris blanchisseurs de boissons	1,5%	0,3%	0,2%	0,6%	0,7%
03	Glaces de consommation	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
04.2.1	Fruits et légumes séchés	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
04.2.4.1	Préparations de fruits et de légumes, à l'exclusion des compotes	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
04.2.6	Produits de pommes de terre transformés	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
05.1	Produits de cacao et de chocolat visés dans la directive 2000/36/EC	16,8%	10,0%	6,5%	3,6%	3,6%
05.2.1	Autres confiseries avec sucre ajouté	5,6%	7,3%	5,8%	4,5%	4,1%
05.2.2	Autres confiseries sans sucre ajouté	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,2%
05.3.1	Chewing gum avec sucre ajouté	0,0%	0,0%	0,1%	0,1%	0,0%
05.3.2	Chewing gum avec sucre ajouté	0,0%	0,0%	0,1%	0,2%	0,1%
05.4	Décorations, enrobages et fourrages, à l'exclusion des fourrages à base de fruits relevant de la catégorie 4.2.4	0,0%	0,1%	0,1%	0,2%	0,1%
06.3	Céréales pour petit-déjeuner	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
06.7	Céréales précuites ou transformées	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
07.2	Produits de boulangerie fine	12,7%	14,9%	13,6%	15,4%	20,5%
09.1.1	Poissons non transformés	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
09.1.2	Mollusques et crustacés non transformés	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
09.2	Poisson et produits de la pêche transformés, y compris mollusques et crustacés	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
11.4	Edulcorants de table	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
12.4	Moutarde	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
12.5	Soupes, potages et bouillons	0,2%	0,1%	0,1%	0,2%	0,4%
12.6	Sauces	5,9%	6,7%	9,2%	12,4%	13,7%
12.7	Salades et pâtes à tartiner salées	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
12.9	Produits protéiques, à l'exclusion des produits relevant de la catégorie 1.8	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,1%
14.1.4.1	Boissons aromatisées avec sucre	24,9%	37,7%	45,5%	42,1%	28,3%
14.1.4.2	Boissons aromatisées aves edulcorants	4,0%	1,8%	2,6%	3,9%	2,8%
15.1	Amuse-gueules à base de pommes de terre, de céréales, de farine, d'amidon ou de fécule	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
15.2	Fruits à coque transformé	0,2%	0,2%	0,2%	1,2%	2,0%
16	Desserts, à l'exclusion des produits relevant des catégories 1, 3 et 4	21,7%	16,1%	11,9%	12,4%	18,7%

Dans le cas du scénario moyen, les boissons aromatisées avec sucre sont le contributeur majoritaire chez les enfants (3-9 ans), les adolescents et les adultes. Les 4 principaux contributeurs chez les enfants (3-9 ans), les adolescents et les adultes sont identiques : les boissons aromatisées avec sucre, les produits de boulangerie fine, les desserts, les sauces.

Le classement de ces contributeurs varie selon la classe d'âge. Chez les enfants (1-2 ans) et les personnes âgées, les premiers contributeurs sont respectivement les desserts et les produits de boulangerie fine. Enfin, les produits de boulangerie fine, les boissons aromatisées avec sucre et les desserts font systématiquement partis des 5 premiers contributeurs quelle que soit la classe d'âge.

Dans le cas du scénario maximaliste, les boissons aromatisées avec sucre sont le premier contributeur pour l'ensemble des classes d'âges. Pour les enfants (3-9 ans), les adolescents et les adultes, les 3 principaux contributeurs sont : les boissons aromatisées avec sucre, les desserts et les produits de boulangerie fine. Le classement de ces contributeurs varie selon la classe d'âge. Enfin, au même titre que le scénario moyen d'exposition, les produits de boulangerie fine, les boissons aromatisées avec sucre et les desserts font systématiquement partis des 5 premiers contributeurs quelle que soit la classe d'âge.

3.3.3. Calcul d'exposition des consommateurs à la fraction nanométrique de l'additif alimentaire E171

3.3.3.1. Méthodologie

Les données relatives aux niveaux de concentration des particules appartenant à l'échelle nanométrique du E171 sont limitées à un faible nombre de mesures effectuées sur des confiseries, des desserts, des chewing-gums et des produits de boulangerie. Ces catégories alimentaires ne sont pas représentatives des habitudes de consommations alimentaires à l'échelle nationale. Dans ce contexte, le GT a mis en place une méthodologie alternative. A partir des niveaux d'exposition au E171 déterminés dans la partie précédente et des pourcentages massiques de la fraction nanométrique du E171 (voir ci-dessous), le GT a établi des niveaux d'exposition des consommateurs à la fraction nanométrique du E171.

- <u>Données issues des travaux du GT</u>

Le GT a collecté des données de caractérisation physico-chimique (Dudefoi *et al*. 2017) de 16 échantillons de E171 correspondant soit à des poudres brutes soit à des extraits de produits alimentaires. Dans son guide d'évaluation du risque sanitaire spécifique aux nanomatériaux (Anses 2021), le GT a élaboré une méthodologie permettant de déterminer le pourcentage massique de particules appartenant à la nano-échelle. Brièvement, les données ont été traitées par le GT de la manière suivante : le diamètre équivalent surface a permis de calculer le volume (en faisant l'hypothèse que les particules sont sphériques) puis la masse de chaque particule à partir de la densité de l'anatase (d = 3,895), cette forme cristalline étant la forme majoritaire dans les échantillons de E171. Enfin, la contribution massique de chaque particule au sein de l'échantillon de E171 considéré a été calculée. A partir de ces données, le GT a déterminé pour chaque échantillon la contribution massique des particules présentant un diamètre inférieur à 100 nm. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 6.

- <u>Données issues de la publication de Verleysen *et al.* (2020)</u>

Dans cette étude, les distributions granulométriques de 15 échantillons de E171 ont été déterminées par microscopie électronique. Parmi ces 15 échantillons, 9 ont été achetés sur

des sites spécialisés en ligne et 6 ont été fournis par les industriels. Dans cette étude, afin de calculer le volume puis la masse des particules, les auteurs ont fait l'hypothèse que les particules sont des ellipsoïdes. Parmi les échantillons analysés, 3 ont été identifiés comme étant une association de plaquettes de mica (de taille micrométrique) recouvertes de particules nanométriques de TiO_2. Cette substance est utilisée non pas dans l'optique d'obtenir une coloration blanche mais un effet brillant (nacré). Le GT a exclu ces 3 échantillons de sa base de données car d'un point de vue règlementaire, ces associations mica/TiO_2 ne peuvent être considérées comme du E171. De plus, du fait du manque d'information relative à l'usage de cette assemblage mica/TiO_2, le GT n'est pas en mesure d'identifier les catégories alimentaires susceptibles de contenir cette substance ni dans quelles proportions. Les échantillons de E171 issus des travaux du GT sont présentés dans le Tableau 6 et ceux issus de la publication de Verleysen *et al.* (2020) dans le Tableau 7.

Tableau 6. **Pourcentages de la fraction nanométrique de différents lots de E171 exprimés en nombre et en masse pour chacun des 16 échantillons analysés par le GT**

N° de l'échantillon	Description de l'échantillon source	% de particules < 100 nm (en nombre)	% de particules < 100 nm (en masse)
1	Produit de type chewing-gum	6,2	0,5
2	Produit de type chewing-gum	13,8	1,6
3	Gâteau de type napolitain	14,9	1,9
4	Sauce de produit type blanquette	19,8	4,7
5	Poudre de E171	30	4,7
6		39,5	10
7		45,3	13,2
8		47,4	6,1
9		55,5	17
10		15,3	2,5
11		35,5	11,8
12		28,8	8,0
13		25,7	5,4
14		30,8	5,9
15		20,5	3,0
16		17,9	4,0
Valeur moyenne		27,9	6,3

Valeur maximale	55,5	17,0

Tableau 7. Pourcentages de la fraction nanométrique de différents lots de E171 exprimés en nombre et en masse issus de la publication de Verleysen *et al.* (2020).

N° de l'échantillon	Description de l'échantillon source	% de particules < 100 nm (en nombre)	% de particules < 100 nm (en masse)
E171-02	Poudre de E171	74	33
E171-03		64	29
E171-04		67	32
E171-06		65	29
E171-07		73	31
E171-09		71	32
E171-A		40	10
E171-B		70	30
E171-C		56	20
E171-D		18	2
E171-E		65	27
E171-F		20	3

Valeur moyenne	56,9	23.2
Valeur maximale	74	33

Le GT a fait le choix de ne pas combiner ces 2 jeux de données (Tableau 6 et Tableau 7) car les méthodes de calcul des volumes des particules (particules assimilées à des sphères pour le GT et à des ellipses pour Verleysen *et al.* (2020)) sont différentes. Afin de quantifier l'influence de la morphologie (sphère ou ellipse) sur le calcul du volume et donc de la masse des particules, le GT a utilisé le rapport de forme[20] mesuré sur les particules de E171 dans la publication de Verleysen *et al.* (2020). Dans le cas d'une sphère parfaite, le rapport de forme est de 1, ce dernier est supérieur à 1 lorsque l'objet présente une anisotropie (ellipse, bâtonnet, aiguille, etc.). Plus la particule est allongée*, i.e.* plus l'anisotropie est forte et plus le rapport de forme sera élevé. Dans le cas du E171, le rapport de forme le plus élevé est de 1,26 (assemblage mica/TiO_2 exclu). Ce rapport de forme permet de fixer les dimensions de l'ellipse

[20] Le rapport de forme, défini par la taille de l'axe majeur sur l'axe mineur, permet de caractériser le paramètre d'élongation des particules.

pour le calcul des volumes. Si a, b et c sont respectivement la longueur, la hauteur et la largeur et en faisant l'hypothèse que b=c, alors d'après le rapport de forme, b =a/1,26. Une diminution du volume de 37% est observé pour l'hypothèse selon laquelle la particule est assimilée à une ellipse par rapport à l'hypothèse selon laquelle la particule est sphérique. Ainsi, les différences de pourcentages massiques observés pour les échantillons issus des Tableau 6 et Tableau 7 sont liés aux méthodes de calculs ainsi qu'à la variabilité de production des lots.

Enfin, les niveaux d'exposition des consommateurs à la fraction nanométrique du E171 sont issus du produit des niveaux d'exposition au E171 (Tableau 3) par la contribution (pourcentage) massique moyenne ou maximale de la fraction nanométrique telle que rapportées dans les (Tableau 6 et Tableau 7).

3.3.4. Résultats

La méthodologie mise en place par le GT a permis de déterminer un pourcentage massique moyen et maximal de particules appartenant à la nano-échelle pour 2 jeux de données différents (avec 2 hypothèses de calcul des volumes des particules différentes). Le Tableau 6 indique que les valeurs moyenne et maximale de ce pourcentage massique sont respectivement de 6,3 et 17% pour les données générées par le GT. Les données issues de la publication de Verleysen *et al.* (2020) ont permis de calculer un % massique moyen et maximal de 23,2 et 33%.

Le Tableau 8 indique les niveaux d'exposition à la fraction nanométrique du E171 déterminés à partir des niveaux d'exposition au E171 (scénario moyen ou maximaliste) et des pourcentages massiques moyen et maximal de la fraction nanométrique (issus des travaux du GT ou de Verleysen *et al.* (2020).

Dans le cas où le scénario d'exposition maximaliste au E171 et le % massique maximale (17%) issus des travaux du GT sont considérés, les niveaux d'exposition moyens varient de 2,5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 16,7 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants (3-9 ans). Au 95ème centile, les niveaux d'exposition varient de 6,7 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 47,6 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants (1-2 ans). En considérant le % massique maximal (33%) déterminé à partir des données de Verleysen *et al.* (2020), les niveaux d'exposition moyens varient de 4,8 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 32,5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants (3-9 ans). Au 95ème centile, les niveaux d'exposition varient de 13,1 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 92,4 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants (1-2 ans).

Dans le cas où le scénario représentatif d'une exposition moyenne au E171 et le % massique moyen (6,3%) issus des travaux du GT sont considérés, les niveaux d'exposition moyens varient de 0,1 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 0,7 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants (1-2 ans). Au 95ème centile, les niveaux d'exposition varient de 0,3 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 2,1 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants (1-2 ans). En considérant le % massique moyen déterminé à partir des données de Verleysen *et al.* (2020), les niveaux d'exposition moyens varient de 0,5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 2,6 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants (1-2 ans). Au 95ème centile, les niveaux d'exposition varient de 1,1 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 7,9 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants (1-2 ans).

Tableau 8. Niveaux d'exposition à la fraction nanométrique du E171 pour les 5 classes d'âge considérées

N° du scénario	Description du scénario d'exposition au E171	% massique de nanoparticules du E171		Niveaux d'exposition à la fraction nanométrique du E171 (mg / kg pc / jour)									
				Enfants (1-2ans)		Enfants (3-9 ans)		Adolescents (10-17 ans)		Adultes (18-65 ans)		Personnes agées (+ de 65 ans)	
				Moy.	P95	Moy.	P95	Moy.	P95	Moy.	P95	Moy.	P95
		Sources	% massique										
1	Scénario maximaliste	GT nano	6,3	5,6	17,6	6,2	14,2	3,2	8,1	1,6	4,7	0,9	2,5
			17	15,0	47,6	16,7	38,2	8,6	21,9	4,4	12,8	2,5	6,7
		Verleysen et al. 2021	23,2	20,4	65,0	22,9	52,2	11,7	29,8	6,0	17,4	3,4	9,2
			33	29,1	92,4	32,5	74,2	16,7	42,4	8,5	24,8	4,8	13,1
2	Scénario moyen	GT nano	6,3	0,7	2,1	0,7	1,5	0,4	0,8	0,2	0,5	0,1	0,3
			17	1,9	5,8	1,9	4,1	1,0	2,3	0,6	1,4	0,4	0,8
		Verleysen et al. 2021	23,2	2,6	7,9	2,6	5,6	1,3	3,1	0,8	2,0	0,5	1,1
			33	3,7	11,3	3,8	8,0	1,9	4,4	1,1	2,8	0,7	1,6

3.3.5. Incertitudes relatives aux calculs des expositions

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

- Le nombre de données relatives aux concentrations en E171 est très hétérogène en fonction des catégories alimentaires. En effet, pour 25% des catégories alimentaires une seule donnée de concentration est disponible, pour 45% des catégories alimentaires le nombre de données de concentration est inférieur ou égal à 5 et pour 72% des catégories alimentaires le nombre de données est inférieur ou égal à 10. Le faible nombre de données de concentration en E171 à disposition entraîne une grande incertitude sur le calcul des expositions.
- Les produits alimentaires ont été analysés à l'aide de techniques analytiques différentes (ICPMS[21], HR-ICPMS[22], ICP-AES[23], spectrophotométrie UV, etc.). Ces techniques présentent des performances analytiques différentes (limites de détection

[21] Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
[22] Spectrométrie de masse haute résolution à plasma à couplage inductif
[23] Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif

(LOD) et de quantification (LOQ)). L'utilisation de techniques analytiques peu sensibles peut entraîner une sous-estimation des niveaux de concentration et donc des niveaux d'exposition au E171.

- Dans certains cas, la description des produits alimentaires considérés n'a pas permis de les catégoriser clairement au sein des catégories alimentaires définies dans le règlement sur les additifs alimentaires (catégories FCS). A titre d'exemple, 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 présentant les descriptions les plus englobantes.
- 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 332 données analytiques). Le GT précise que, dans le cas de ces données exclues, les concentrations en E171 étaient parmi les plus faibles (inférieures à 0,5 mg/kg). De même, un produit alimentaire n'a pas été considéré car le E171 n'a pas été détecté et que les LOD et LOQ n'étaient pas précisées. L'exclusion de ces denrées, présentant des concentrations faibles en TiO_2, pourrait entraîner un effet maximisant sur les calculs d'exposition.
- Parmi les données analysées, certaines provenaient de catégories alimentaires pour lesquelles l'utilisation du E171 n'était pas autorisée par la réglementation (avant son interdiction en 2022). Dans ce cas, la détection de TiO_2 peut s'expliquer par le « carry over » *i.e.* le E171 est apporté dans le produit fini par d'autres ingrédients. De plus, les difficultés de catégorisation des produits alimentaires, comme expliqué précédemment, peuvent également expliquer certains de ces résultats.
- Certaines catégories alimentaires pour lesquelles le GT a collecté des données de concentration n'ont pas été utilisées dans les calculs d'exposition :
    - 08.3.3 : boyaux, enrobages et décorations pour viande car cette catégorie n'est pas renseignée dans le logiciel FAIM ;
    - 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. Les concentrations collectées pour les compléments alimentaires sont indiquées pour information mais n'ont pas été considérées dans les calculs d'exposition car ces usages ne rentrent pas dans le cadre de cette saisine (voir introduction).

  La non prise en compte de ces catégories alimentaires entraîne une sous-estimation des niveaux d'exposition.
- Le calcul de la fraction massique de particules appartenant à la nano-échelle repose sur l'hypothèse selon laquelle toutes les particules sont considérées comme étant des sphères ou des ellipses. La détermination de la fraction massique nécessite également d'avoir à disposition la distribution granulométrique des échantillons de E171. Or, ce type de mesure n'est pas systématiquement renseigné au sein des publications.
- Enfin, dans le cadre de la détermination de la fraction massique des nanoparticules, le nombre de particules analysées par échantillon n'était pas homogène (en moyenne, 270 particules ont été analysées avec un minimum de 133 et un maximum de 450).

3.4. Identification et caractérisation du danger de la fraction nanométrique du E171

3.4.1. Méthodologie

Afin de collecter des données toxicologiques relatives à la fraction nanométrique du E171, le GT a effectué une recherche bibliographique dans la base de données PubMed. Deux équations de recherche ont été formulées, la première concernant les données *in vivo* et la seconde relative aux données de génotoxicité *in vitro*. Ces deux recherches ont été décorrélées afin de cibler et d'évaluer plus efficacement les publications scientifiques. Les équations de recherche sont présentées en Annexe 2. Suite à cette recherche bibliographique, le GT a collecté 193 publications relatives à des études *in vivo*. Après une première lecture de ces publications, le GT a appliqué des critères de sélection. Ont été exclues les publications qui n'étaient pas rédigées en anglais, qui étaient hors sujet, qui n'étaient pas conduites sur un modèle mammifère (ex : poisson) et qui ne présentaient pas de caractérisation physico-chimique des particules à partir d'observation en microscopie électronique (voir Anses 2021). Suite à cette sélection, le GT a expertisé 56 publications issues d'études toxicologiques *in vivo*. Concernant les données de génotoxicité *in vitro*, 29 publications ont été collectées, seules les études publiées après la revue de Charles *et al.* (2018) ayant été considérées. Ont été exclues les publications qui n'étaient pas rédigées en anglais, qui étaient hors sujet, qui utilisaient des modèles non mammifères (ex : mollusques, vers de terre) et qui ne présentaient pas de caractérisation physico-chimique des particules à partir d'observation en microscopie électronique. Suite à cette sélection, le GT a expertisé 11 publications issues d'études de génotoxicité *in vitro*.

Le recherche bibliographie a été clôturée en juillet 2021.

Les résumés des études expertisées par le GT sont tabulés dans l'Annexe 3.

Les études toxicologiques ont été regroupées selon différents paramètres : la durée des expositions, le respect des lignes directrices de l'OCDE, ou encore la nature du TiO_2 testé. En effet, les analyses physico-chimiques indiquent que la plus petite taille de particules observée dans la distribution granulométrique des lots de E171 évalués par le GT est de 10 nm. Ainsi, le GT a distingué les études menées avec du E171, du nanoTiO_2 dont la taille est comprise entre 10 et 100 nm et celles menées avec du nanoTiO_2 < 10 nm.

3.4.2. Toxicocinétique

Il est rappelé que les nanoparticules sont généralement peu absorbées au niveau de la barrière intestinale suite à une administration par voie orale et que la distribution et l'accumulation dans les différents organes ne pourront être a priori déterminées de manière fiable que pour des durées d'exposition suffisamment longues et estimées à au moins 14 jours (guide EFSA 2018). Le GT s'est uniquement intéressé aux études de toxicocinétique chez des rongeurs exposés par voie orale.

- **Etudes à court terme (exposition < 14 jours)**

  - E171

Dans l'étude de Coméra *et al.* (2020), des souris ont été exposées par administration unique intra-gastrique de E171 à une dose de 40 mg (kg pc)$^{-1}$. Les auteurs ont mis en évidence par microscopie confocale (et confirmé en microscopie électronique couplé à l'EDX pour les tissus intestinaux) une augmentation statistiquement significative de particules de TiO_2 dans les villosités et les plaques de Peyer du jéjunum (respectivement 4 et 8h après l'administration) ainsi que dans le sang (4 et 8h après l'administration). Cette augmentation n'est pas significative dans l'iléon et le colon. Les auteurs ont également mesuré une augmentation statistiquement significative de la quantité de titane (par ICP) dans les tissus du jéjunum, de l'iléon et du colon. Malgré la présence de particules dans le sang, le niveau de titane reste inférieur aux limites de détection. La proportion de titane absorbée par l'intestin dans le cadre de ce schéma expérimental est très faible (0,007% de la quantité administrée).

  - NanoTiO_2 compris entre 10 et 100 nm

L'étude de Kreyling *et al.* (2017) s'est intéressée à la toxicocinétique de particules de TiO_2 (< 50 nm) radiomarquées avec du vanadium chez des rats femelles après une administration unique par gavage à des doses comprises entre 30 et 80 µg (kg pc)$^{-1}$. Cette technique de radiomarquage permet de localiser précisément le devenir *in vivo* des particules de TiO_2 dans les tissus avec une grande sensibilité. Des particules de TiO_2 ont été détectées 7 jours après l'administration dans le foie, les reins, les poumons, le cerveau et la rate.

De même, des études chez le rat ont mis en évidence (par ICP) une augmentation statistiquement significative de la concentration en titane dans le foie, le cerveau, les reins et les poumons entre 6 et 24h après une administration unique orale de TiO_2 présentant des tailles variant de 17 à 153 nm et à des doses de 300 mg (kg pc)$^{-1}$ (Lee *et al.* 2019) ou 500 mg (kg pc)$^{-1}$ (Jo *et al.* 2016). Dans l'étude de Janer *et al.* (2014), aucune augmentation statistiquement significative de la concentration en titane (mesuré par ICP) n'a été mesurée dans le foie, la rate, les ganglions lymphatiques mésentériques, les plaques de Peyer, le petit intestin et le caecum de rats 24h après une administration unique orale de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ de nanoparticules de TiO_2 de 18 nm.

Dans le cas d'administrations répétées chez des rats par gavage ou par l'alimentation et pour des niveaux d'exposition variant de 1 à 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}, du titane a été détecté (par ICP) dans le foie, les reins et la rate à des niveaux faibles et de manière sporadique dans les études de Farrell & Magnuson (2017) et Geraets *et al.* (2014) ou à des niveaux plus élevés dans le foie (Nie *et al.* 2021 et Lee *et al.* 2019) et la rate (Tassinari *et al.* 2014). Le titane a également été détecté dans les ganglions lymphatiques mésentériques (Geraets *et al.* 2014) à partir de 6,8 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} et dans la paroi du petit intestin de rats exposés 5 jours à 2 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Ammendolia *et al.* 2017). Chez la souris, le titane est également détecté (par ICP) 24h après la première administration et les concentrations restent constantes pendant 2 semaines dans les cellules gastriques (à partir d'une dose de 5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}) avec une augmentation de la concentration en titane dose-dépendante dans l'étude de Mohamed 2015. L'étude de

Tassinari *et al.* (2014) indique que l'augmentation de la concentration en titane au sein de la thyroïde n'était pas significative par rapport au groupe témoin.

Certaines études se sont plus particulièrement intéressées aux organes de la reproduction chez le rat et la souris à la suite d'une administration unique par instillation intra œsophagienne ou d'administration répétées par gavage. Ces études ont mis en évidence la présence de particules de TiO_2 (Kreyling *et al.* 2017, Zhang *et al.* (2018) ou de titane (Lee *et al.* 2019, Tassinari *et al.* 2014, Yao *et al.* 2021) dans les ovaires, l'utérus, le placenta et les glandes mammaires avec passage des particules dans le colostrum puis dans l'intestin et l'estomac des descendants allaités (Yao *et al.* (2021). Une autre étude (Lee *et al.* 2019) s'intéressant à l'exposition par gavage de rates gestantes souligne la présence de titane dans le foie, le cerveau et le placenta maternel mais l'absence de titane dans le sang, le foie et le cerveau des descendants même après une exposition des mères à 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ pendant 15 jours.

Les organes plus rarement analysés (carcasse) ont révélé la présence de nanoparticules de TiO_2 dans le squelette, la peau et les muscles de rats après administration unique de TiO_2 radiomarqué à des doses faibles variant de 30 à 80 µg $(kg\ pc)^{-1}$ dans l'étude de Kreyling *et al.* 2017. Une augmentation sporadique de titane est également observée dans les muscles de rats après administrations répétées sur 7 jours (Farrell & Magnuson 2017) de doses plus importantes variant de 24 à 30 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$.

- <u>NanoTiO_2 <10 nm</u>

Deux études s'intéressant à l'exposition de rats ou de souris à du TiO_2 dont la taille est inférieure ou égale à 10 nm et basées sur des administrations uniques (exposition à ~ 9 mg $(kg\ pc)^{-1}$; Modrzynska *et al.* 2018) ou répétées (exposition entre 6,8 et 8,6 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ pendant 5 jours ; Geraets *et al.* 2014) concluent à l'absence de détection de titane dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques mésentériques. Néanmoins, dans l'étude de Zhang *et al.* (2018), des particules de TiO_2 ont été observées dans les cellules du placenta de souris gestantes exposées à des doses répétées de 1 ou 10 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ durant les 13 premiers jours de gestation.

- **<u>Etudes avec durée d'exposition comprise entre 14 et 90 jours</u>**

- <u>E171</u>

Dans l'étude de Talamini *et al.* (2019), du E171 a été administré à des souris par voie orale (à l'aide d'une pipette) pendant 15 jours (3 fois par semaine) à une dose de 5 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$. D'après les auteurs, la concentration de titane dans le cerveau, le rein et les testicules était inférieure à la limite de quantification et l'augmentation de la concentration en titane n'était pas significative dans les poumons et la rate par rapport au groupe témoin. Néanmoins, les auteurs ont mis en évidence une augmentation significative de la concentration en titane (par ICP) dans les tissus du petit et du gros intestin, du foie et de l'estomac.

- NanoTiO$_2$ compris entre 10-100 nm

Les résultats de toxicocinétique chez des rats exposés par gavage à des niveaux de doses compris entre 0,5 et 1041 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour des tailles de particules de TiO$_2$ comprises entre 10 et 100 nm ne permettent pas de dégager un schéma toxicocinétique clair. Dans les études de Martins *et al.* (2017) et de Cho *et al.* (2013), l'augmentation de la concentration en titane (par ICP) dans le sang est significative par rapport au groupe témoin. Concernant les autres organes, Wang *et al.* (2013) ont montré la présence de nanoparticules de TiO$_2$ dans les muqueuses du petit intestin et de l'estomac et Martins *et al.* (2017) ont montré que l'augmentation de la concentration en titane dans le foie et les reins est significative par rapport au groupe témoin. A contrario, les études de Cho *et al.* (2013) et Wang *et al.* (2013) indiquent que cette augmentation n'est pas significative dans le foie et les reins ainsi que dans la rate et le cerveau. Les études de Gao *et al.* (2020) et Yao *et al.* (2020) ont respectivement montré, pour des durées d'exposition de 28 jours, une augmentation du nombre de nanoparticules de TiO$_2$ dans des vésicules intracellulaires de cellules intestinales de rats gavés à 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} et une augmentation de la concentration en titane dans les tissus de l'iléon de souris gavées à 300 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}.

- NanoTiO$_2$ < 10 nm

Dans l'étude de Hong *et al.* (2017), l'exposition de souris gestantes au TiO$_2$ (6,5 nm) à des niveaux de doses compris entre 25 et 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} a entraîné une augmentation significative de la concentration en titane dans le placenta et le sang maternel ainsi que dans le fœtus (organes non précisés).

- **Etudes avec durée d'exposition > 90 jours**

- E171

Aucune étude de toxicocinétique utilisant du E171 et des temps d'exposition supérieurs à 90 jours n'a été identifiée par le GT.

- NanoTiO$_2$ compris entre 10-100 nm

Hu *et al*. (2018) ont montré que l'exposition de souris à des nanoparticules de TiO$_2$ de 26 nm pendant 182 jours à des doses comprises entre 10 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} a entraîné une augmentation significative de la concentration en titane dans le foie, le pancréas, la rate, les reins et le petit intestin. La présence de nanoparticules de TiO$_2$ dans les cellules épithéliales de l'intestin ainsi qu'une augmentation de la concentration en titane dans les cellules sanguines est observée chez des souris gavées à 10 mg de TiO$_2$ (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} après 6 mois d'exposition (Zhang *et al.* 2021).

- NanoTiO$_2$ < 10 nm

Aucune étude de toxicocinétique utilisant des particules de TiO$_2$ < 10 nm et des temps d'exposition supérieurs à 90 jours n'a été identifiée par le GT.

Conclusions des études toxicocinétiques

Le GT s'est intéressé à des études de toxicocinétique menées chez des rongeurs exposés à du TiO_2 par voie orale. Différentes études ont montré que la quantité de nanoparticules de TiO_2 absorbées représente un faible pourcentage de la dose administrée (jusqu'à 0,6% (m/m) dans Kreyling *et al.* 2017). La translocation des particules à travers l'épithélium intestinal reposerait sur un mécanisme actif d'endocytose au niveau des villosités intestinales et sur un mécanisme passif (voie paracellulaire) entre les entérocytes ou les cellules calciformes (Coméra *et al.* 2020).

Les nanoparticules de TiO_2 se distribuent dans la plupart des organes, dont les organes de la reproduction, avec une transmission possible des nanoparticules de la mère vers la descendance au cours de la gestation (Hong *et al.* 2017) et de l'allaitement (Yao *et al.* 2021).

Les nanoparticules de TiO_2 sont majoritairement excrétées dans les fèces dans les 24h suivant l'administration et dans une moindre mesure dans les urines.

Des données de persistance (Kreyling *et al.* 2017) indiquent que les particules de TiO_2 sont observées dans les principaux organes dans les premières heures (de 1 à 4h après administration selon les organes) puis sont éliminées (4h à 24h après administration selon les organes) jusqu' au 7ème jour (fin de l'observation) après administration. Néanmoins, dans cette étude, aucune clairance n'est observée pour les reins et le cerveau.

Des données de persistance à plus long terme ont été obtenues suite à des injections intraveineuses de particules de TiO_2 chez des rats (Geraets *et al.* 2014). Une distribution rapide dans les organes notamment le foie, la rate et les poumons avec une redistribution possible du titane du foie vers la rate a été observée. Les niveaux de titane restent élevés dans ces 3 organes 90 jours après l'administration soulignant une élimination lente.

Au vu de l'ensemble des résultats analysés, les particules de TiO_2 sont peu absorbées au niveau intestinal après exposition par voie orale. Les particules absorbées seraient principalement accumulées dans les carcasses et les organes tels que le foie, les reins, la rate, le cerveau, les poumons, et l'utérus. Les cinétiques d'éliminations de ces particules semblent lentes ce qui pose la question des effets à plus ou moins longs termes des nanoparticules de TiO_2 bioaccumulées suite à des expositions répétées.

Au vu de la diversité des particules de TiO_2 utilisées, du faible nombre d'études et des résultats observés, le GT n'est pas en mesure d'identifier un effet de la taille, de la morphologie ou de la cristallinité des nanoparticules sur les phénomènes d'absorption, de distribution et d'excrétion.

Le GT souligne l'absence fréquente de précisions relatives aux performances analytiques (LOD ou LOQ) des techniques utilisées pour quantifier le titane dans les organes ainsi que l'absence d'EDX lors des observations des tissus en microscopie électronique (Zhang *et al.* 2018 et 2021, Wang *et al.* 2013, Gao *et al.* 2020) ne permettant pas de confirmer l'identification élémentaire des particules.

D'après le guide méthodologique de l'Anses relatif à l'ERS nanospécifique (Anses 2021), la présence de particules de TiO_2 dans les différents organes systémiques, de la reproduction et le cerveau souligne que les études de neurotoxicité, de toxicité pour la reproduction et le développement et de cancérogenèse doivent être considérées pour la caractérisation du risque de la fraction nanométrique du E171.

3.4.3. Génotoxicité

Dans le cadre de son expertise, le GT a considéré des études de génotoxicité *in vitro* et *in vivo*. Les tests de génotoxicité relatifs au nanoTiO_2 tels que rapportés dans la bibliographie se focalisent essentiellement sur les tests règlementaires des comètes et du micronoyau. Le test des comètes mesure l'effet potentiel d'une substance (ici le nanoTiO_2) à générer des lésions de l'ADN. Le test du micronoyau est révélateur de mutations chromosomiques ou génomiques.

Des pondérations de preuves différentes ont été attribuées à ces tests (ECHA 2015, Brusick 2016).

Le test des comètes *in vitro* présente le poids de la preuve le plus faible, il est indicateur de lésions primaires à l'ADN mais présente une faible spécificité sans clairement démontrer de lien avec des mécanismes de tumorigénicité.

Les tests de mutation génique *in vitro*, du micronoyau *in vitro* et des comètes *in vivo* apportent un poids de la preuve modéré. Ces tests sont pertinents pour décrire des paramètres toxicologiques impliqués dans les mécanismes de cancérogenèse ou dans les mécanismes indirects avec des effets à seuils (clastogène cytotoxique, aneugène). Dans le cas du test des comètes *in vivo*, les lésions engendrées à l'ADN peuvent être réparées, il est donc important d'effectuer le test quelques heures après la dernière administration (entre 2 et 6h dans le cas des produits chimiques). De plus, ce test peut présenter un taux élevé de faux positifs. Le test des comètes est décrit dans la ligne directrice de l'OCDE (n°489) et *a priori* tous les organes/tissus peuvent être étudiés pour les dommages à l'ADN.

Les tests *in vivo* du micronoyau et de mutations apportent un poids de la preuve élevé car il s'agit de tests détectant des mutations et non de simples lésions comme le test des comètes ; ils ont démontré, avec un haut niveau de confiance, que les paramètres toxicologiques mesurés jouent un rôle dans le processus de cancérogenèse. Le test des micronoyaux (ligne directrice OCDE n°474) repose sur l'analyse de la moelle osseuse et du sang circulant. Le test de mutation génique sur animaux transgéniques suit la ligne directrice de l'OCDE n°488.

De nombreuse publications revendiquent l'application des lignes directrices OCDE pour les tests de mutation génique, des comètes (*in vivo*) et des micronoyaux. Néanmoins, après analyse de ces études, des écarts méthodologiques ont été identifiées par le GT soulignant le non-respect des recommandations de l'OCDE pour la grande majorité de ces études (voir sections ci-dessous).

3.4.3.1. Génotoxicité *in vitro*

- **Tests de mutations géniques *in vitro***

  - E171

Aucun test de mutations géniques mené avec du E171 n'a été identifié par le GT.

  - NanoTiO_2 compris entre 10 et 100 nm

Concernant les tests de mutations géniques, le GT a identifié 2 études menées sur la base des lignes directrices de l'OCDE.

Dans l'étude de Du *et al.* (2019), la mutagenicité de nanoparticules de TiO_2 (40 nm) a été évaluée selon le test d'Ames. Ce test a été identifié dans différentes études et par le GT comme non compatible avec les nanomatériaux. Un autre test de mutagénicité sur une lignée cellulaire de lymphome murin (OCDE 490) n'a pas révélé de potentiel mutagène à des doses comprises entre 31,2 µg et 2 mg de TiO_2/mL et pour des temps d'exposition de 2 et 24h. Dans l'étude de Kazimirova *et al.* (2020), l'exposition de lignées cellulaires de hamster chinois (OCDE 476) à des nanoparticules de TiO_2 de 21 nm (P25) n'a pas entraîné d'effet mutagène à des concentrations de 3, 15 et 75 µg/cm^2 après 24h d'exposition.

Les 2 études de mutation génique analysées par le GT concluent à l'absence de mutagénicité liée aux nanoparticules de TiO_2 testées. Cependant, le GT n'est pas en mesure de valider ces résultats car il a identifié des manquements au respect des lignes directrices OCDE entraînant des incertitudes quant à l'interprétation des résultats (Tableau 9). Le GT a également identifié l'absence de démonstration à l'internalisation des nanoparticules dans l'étude de Du *et al.* (2019).

- <u>NanoTiO_2 < 10 nm</u>

Aucun test de mutations géniques mené avec du nanoTiO_2 < 10 nm n'a été identifié par le GT.

Tableau 9. Résultats des tests de mutation géniques *in vitro*

Articles	Nanomatériaux	Critères OCDE	Résultats	Commentaires du GT
Du *et al.* (2019)	NanoTiO_2 de 40 nm (moyenne)	Test mené selon la LD OCDE 490 mais absence de données statistiques (nombre de répétitions ? barres d'erreurs ?).	Négatif sur lignée cellulaire de lymphome murin	Résultats non validés car critères OCDE non respectés. De plus le GT note l'absence de preuve d'internalisation intracellulaire et un manque de rigueur dans la caractérisation du nanoTiO_2.
Kazimirova *et al.* (2020)	NanoTiO_2 (P25) de 21 nm (moyenne) ; anatase/rutile	Test mené selon la LD OCDE 476 mais les concentrations maximales ne sont pas justifiées et les seuils de cytotoxicité non atteints.	Négatif sur lignées cellulaires de hamster chinois	Résultats non validés car critères OCDE non respectés.

- **<u>Tests des micronoyaux *in vitro*</u>**

- <u>E171</u>

Aucun test des micronoyaux *in vitro* mené avec du E171 n'a été identifié par le GT.

- <u>NanoTiO_2 compris entre 10 et 100 nm</u>

Le GT a identifié 3 publications relatives aux tests des micronoyaux basés sur la ligne directrice OCDE 487.

Dans l'étude de Kazimirova *et al.* (2019), des lignées cellulaires TK6 (lymphoblastoïde, humain), des lymphocytes de volontaires humains et des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) humains ont été exposées *in vitro* et *ex vivo* à des particules de TiO_2 de 21 nm à des doses de 3, 15 et 75 µg/cm^2 sur une durée de 4 et 24h. Les résultats sont en moyenne négatifs pour l'ensemble des conditions testées. Néanmoins, une augmentation significative des micronoyaux est observée chez certains des donneurs (3 sur 13), suggérant une susceptibilité individuelle particulière.

Andreoli *et al.* (2018) ne mettent pas en évidence de dommages chromosomiques sur les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) lorsque ces dernières sont exposées à 3 types de particules de TiO_2 présentant des morphologies et des tailles différentes et pour des concentrations allant jusqu'à 100 µg/mL. A la concentration de 200 µg/mL de particules, les résultats ne sont pas exploitables car l'observation des micronoyaux est rendue difficile par l'interférence optique des particules.

L'étude de Brandão *et al.* (2020) ne détecte pas d'induction de micronoyaux sur 4 types cellulaires : A549 (cellule épithéliale alvéolaire humaine), HepG2 (hépatocyte humain), A172 (cellule gliale humaine) et SH-SY5Y (neurone humain) après exposition (3 ou 24h) à des particules de TiO_2 de 21 nm (P25) et pour des niveaux de doses variant de 10 à 200 µg/mL.

Les 3 études analysées par le GT soulignent l'absence d'induction de micronoyaux liés aux nanoparticules de TiO_2 sur différents types cellulaires quelles que soient la taille, la morphologie et la forme cristalline des particules. Cependant, le GT n'est pas en mesure de valider ces résultats car il a identifié des manquements au respect des lignes directrices de l'OCDE entraînant des incertitudes quant à l'interprétation des résultats (Tableau 10). Le GT a également identifié l'absence de démonstration relative à l'internalisation des nanoparticules pour l'une de ces études.

- <u>NanoTiO_2 < 10 nm</u>

Aucun test des micronoyaux *in vitro* mené avec du nanoTiO_2 < 10 nm n'a été identifié par le GT.

Tableau 10. Résultats des tests du micronoyau *in vitro*

Articles	Nanomatériaux	Critères OCDE	Résultats	Commentaires du GT
Kazimirova *et al.* (2019)	NanoTiO_2 P25 de 21 nm (moyenne) ; anatase/rutile	Test mené selon la LD 487 mais les concentrations maximales ne sont pas justifiées.	Négatif sur lignées cellulaires TK6 (lymphoblastoïde, humain), lymphocytes de volontaires humains et cellules mononuclées de sang périphérique	Résultats non validés car critères OCDE non respectés. De plus le GT note l'absence de preuve d'internalisation intracellulaire.
Andreoli *et al.* (2018)	NanoTiO_2 sphérique de 20-60 nm (anatase) ou nanoTiO_2 bâtonnet de 30x100 nm (rutile) ou mélange de nanoTiO_2	Test mené selon la LD 487.	Négatif sur cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)	Résultats non validés car le GT note des problèmes d'interférence (agglomérats qui masque les micronoyaux au cours de l'observation en microscopie).

Articles	Nanomatériaux	Critères OCDE	Résultats	Commentaires du GT
	anatase/rutile de 45-262 nm.			
Brandão *et al.* (2020)	NanoTiO$_2$ (P25) de 21 nm (moyenne) ; anatase/rutile	Test mené sur 4 lignées cellulaires selon la LD 487 mais les doses maximales testées ne sont pas justifiées et le seuil de cytotoxicité n'est pas atteint.	Négatif sur A549 (cellule épithéliale alvéolaire humaine), HepG2 (hépatocyte humain), A172 (cellule gliale humaine) et SH-SY5Y (neurone humain).	Résultats non validés car critères OCDE non respectés. De plus le GT note un niveau de micronoyau élevé chez les contrôles et un faible niveau d'incorporation dans une ligné cellulaire (HepG2).

- **<u>Tests des comètes *in vitro*</u>**

Tableau 11. Résultats des tests des comètes *in vitro*

Articles	Nanomatériaux	Critères OCDE	Résultats	Commentaires du GT
Kazimirova *et al.* (2019)	NanoTiO$_2$ (P25) de 21 nm (moyenne) ; anatase/rutile	Non OCDE	Positif sur (PBMC humains) et négatif sur lignées cellulaires TK6 (lymphoblastoïde, humain) et les lymphocytes de volontaires humains avec le protocole de dispersion 1. Avec le protocole de dispersion 2 les résultats sont négatifs pour les 3 types de cellules.	Résultats non validés car le GT note l'absence de test de cytotoxicité et l'absence de justification pour la dose maximale testée.
Andréoli *et al.* (2018)	NanoTiO$_2$ sphérique de 20-60 nm (anatase) ou nanoTiO$_2$ bâtonnet de 30x100 nm (rutile) ou mélange de nanoTiO$_2$ anatase/rutile de 45-262 nm.	Non OCDE	Positif sur PBMC humain avec les 3 nanoTiO$_2$ testés	Résultats validés
García-Rodríguez *et al.* (2018)	NanoTiO$_2$ sphère < 25 nm (anatase) ou nanoTiO$_2$ bâtonnet de 100x250 nm (rutile) ou nanoTiO$_2$ filament de 10 x 100 nm(rutile)	Non OCDE	Positif sur co-culture de cellules Caco-2 et HT29 pour les 3 nanoTiO$_2$ testés.	Résultats non validés car le GT note une incohérence des résultats (diminution de fragmentation pour certaines concentrations) et l'absence d'une augmentation de la fragmentation dose-reliée.
Vila *et al.* (2018)	NanoTiO$_2$ NM 100 de 110 nm (moyenne) ; anatase	Non OCDE	Négatif sur des cellules Caco-2 non différenciées ou différenciées en entérocytes.	Résultats non validés car le GT note des biais méthodologiques (analyse de l'internalisation, utilisation du transwell, nombre de réplicats) et des

Articles	Nanomatériaux	Critères OCDE	Résultats	Commentaires du GT
				incohérences entre les résultats et les conclusions des auteurs
Gea *et al.* (2019)	NanoTiO_2 (bipyramides, ou bâtonnets ou plaquettes), P25 et E171	Non OCDE	Positif sur cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B avec les E171, P25 et nanoplaquettes.	Résultats non validés car le GT note l'absence d'information sur le nombre de cellules analysées, des tests de cytotoxicité incomplets et l'absence de justification pour la dose maximale testée.
Brown *et al.* (2019)	E171	Non OCDE	Positif sur cellules souches embryonnaires murines, lignées cellulaires HepG2 et négatif sur lignées cellulaires Caco-2	Résultats non validés car le GT note l'absence d'un témoin négatif constitué de sérum (la sonication de protéines peut générer des ROS) et l'absence de justification pour la dose maximale testée.
Fresegna *et al.* (2021)	NanoTiO_2 de 44 nm (moyenne) ; 79% anatase et nanoTiO_2 de 77 nm (moyenne) ; 81% rutile	Non OCDE	Positif sur modèles cellulaires pulmonaires A549 et BEAS-2B 2	Résultats non validés car le GT note une normalisation des résultats du % de Tail DNA qui limite leur interprétation.

- <u>E171</u>

Dans l'étude de Gea *et al.* (2018), des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B ont été exposées à du nanoTiO_2 de 21 nm (P25), préalablement exposé à la lumière pendant 1h, entraînent une augmentation du nombre de sites sensibles à la Fpg. Le E171 et les nano-plaquettes causent une augmentation à la fois du nombre de cassures de l'ADN et/ou des sites alkali-labiles et du nombre de sites sensibles à la Fpg. Ces augmentations sont dépendantes de la concentration de TiO_2 à laquelle les cellules sont exposées, et sont significatives dès la concentration de 50 µg/mL pour le P25 et le E171 et de 80 µg/mL pour les nano-plaquettes. L'intensité des dommages est plus forte dans les cellules exposées au E171. Ces dommages sont également présents, dans une moindre mesure, lorsque le système d'essai est à l'obscurité, ce qui sous-entend que les propriétés photocatalytiques du TiO_2 pourrait augmenter l'oxydation de l'ADN via la production d'espèces radicalaires.

Dans l'étude de Brown *et al.* (2019), des cellules souches embryonnaires murines ainsi que des lignées cellulaires HepG2 et Caco-2 ont été exposées à du E171 à des doses variant de 1,95 à 15,6 µg/cm2 durant 4h. Le E171 cause une augmentation du nombre de cassures et/ou de sites alkali-labiles mais pas du nombre de sites sensibles à la Fpg dans des cellules souches embryonnaires murines. Dans les cellules HepG2 ces deux types de dommages augmentent significativement, alors que dans les cellules Caco-2 une augmentation statistiquement non significative des dommages à l'ADN est observée.

- <u>NanoTiO$_2$ compris entre 10 et 100 nm</u>

Dans l'étude de Kazimirova *et al.* (2019), des lignées cellulaires TK6 (lymphoblastoïde, humain), des lymphocytes de volontaires humains et des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) humains) ont été exposées *in vitro* et *ex vivo* à des particules de TiO$_2$ de 21 nm à des doses de 3, 15 et 75 µg/cm^2 sur une durée de 4 et 24h. Lorsque les nanoparticules sont dispersées de façon à ce qu'une suspension peu agglomérée soit obtenue (protocole dispersion 1), celles-ci provoquent une augmentation significative du niveau de cassures dans les PBMC humains, à 75 µg/cm² (4h) et 15 et 75 µg/cm² (24h). En revanche, lorsque les nanoparticules sont agglomérées (protocole dispersion 2), elles ne causent pas d'augmentation du niveau de dommages dans le test des comètes.

Andréoli *et al.* (2018) mettent en évidence une réponse génotoxique (test des comètes) lorsque les cellules mononucléées sanguines périphériques humaines (PBMC) sont exposées à 50, 100 et 200 µg/mL (anatases et anatases/rutiles) ou à 100 et 200 µg/mL (rutiles) de particules pendant 24h. Le test des comètes met en évidence qu'une sous-population cellulaire est plus sensible aux TiO$_2$ que l'autre, et une analyse en cytométrie en flux montre l'interaction préférentielle des TiO$_2$ avec les monocytes, qui les accumulent dès 30 minutes de contact, alors que les lymphocytes n'ont pas accumulé de TiO$_2$ après 2h de contact. Les auteurs montrent également une élévation du niveau intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les monocytes mais pas dans les lymphocytes, témoignant d'un possible mécanisme génotoxique par le stress oxydant.

García-Rodríguez *et al.* (2018) montrent que des nanosphères, nanobâtonnets et nanofils de TiO$_2$ dispersés selon le protocole standard du projet Nanogenotox provoquent des cassures de l'ADN et/ou des sites alkali-labiles sur une co-culture de cellules Caco-2 et HT29 après 24h d'exposition à des concentrations allant de 12,5 à 350 µg/mL, qui subsistent après 48h d'exposition dans le cas des nanobâtonnets et à la plus forte concentration de nanosphères. Ces dommages sont corrélés avec la biopersistence des TiO$_2$ dans les cellules, les nanobâtonnets persistant plus longtemps que les autres formes de TiO$_2$. Le test des comètes modifié par l'ajout de Fpg montre une diminution du nombre de sites sensibles à la Fpg, après exposition pendant 24h à 150 ou 350 µg/mL aux nanosphères et nanobâtonnets, et à 50 et 150 µg/mL de nanofils de TiO$_2$.

Vila *et al.* (2018) ont étudié la génotoxicité de nanoparticules de TiO$_2$ de 110 nm sur des cellules Caco-2 non différenciées ou différenciées en entérocytes, exposées pendant 24h à des concentrations variant de 10 à 200 µg/mL. Ces nanoparticules de TiO$_2$ augmentent le nombre de cassures de l'ADN et/ou des sites alkali-labiles dans le test des comètes uniquement à la plus faible concentration testée (10 µg/mL). Elles n'induisent pas d'augmentation du nombre de sites sensibles à la Fpg dans le test des comètes modifié par ajout de Fpg. Les auteurs concluent à l'absence d'effet génotoxique dans ces conditions d'exposition.

Dans l'étude de Fresegna *et al.* (2021), deux modèles cellulaires pulmonaires A549 et BEAS-2B ont été exposées à 2 types de nanoTiO$_2$ de 44 nm (anatase) et 77 nm (rutile) pendant 2h ou 24h à des doses variant de 1 à 40 µg/mL. Les nanoTiO$_2$ de 44 nm entraînent une augmentation de la fragmentation uniquement dans les cellules A549 après 2h d'exposition alors que les nanoTiO$_2$ de 77 nm entraînent une augmentation de la fragmentation dans les 2

lignée cellulaire à 2 et 24h. Les dommages oxydatifs sont observés pour les 2 types de nano TiO_2 uniquement dans les cellules A549 à 2 et 24h.

- <u>NanoTiO$_2$ < 10 nm</u>

Aucun test des comètes *in vitro* mené avec du nanoTiO$_2$ < 10 nm n'a été identifié par le GT.

- **<u>Autres tests</u>**

Tableau 12. Autres tests de génotoxicité *in vitro* (non OCDE)

Articles	Nanomatériaux	Critères OCDE	Résultats	Commentaires du GT
Wang *et al.* (2019)	3 nanoTiO$_2$ de 5, 15 et < 100 nm	Test γ-H2Ax (non OCDE)	Positif sur cellules hybrides humain-hamster avec les 3 nanoTiO$_2$	Résultats non validés car le GT note l'absence de méthode quantitative pour évaluer la génotoxicité et un manque de rigueur dans la caractérisation du TiO$_2$.
		Test de mutation sur CD 59 (non OCDE)	Positif sur cellules hybrides humain-hamster avec les 3 nanoTiO$_2$	Résultats non validés car le GT note un manque de rigueur dans la caractérisation du TiO$_2$.

Wang *et al.* (2019) ont évalué les effets mutagènes de nanoparticules de nanoTiO$_2$ (anatase), de 5, 15 et <100 nm sur des cellules AL hybrides humain-hamster obtenues par fusion de fibroblastes humains avec des cellules CHO-K1 présentant une mutation gly-A. Les auteurs indiquent que ces cellules présentent une sensibilité particulière aux agents mutagènes. Les cellules sont exposées aux nanoTiO$_2$ soit dans leur état pristine, soit « vieillies » pendant 60 jours (le vieillissement a consisté à laisser les suspensions de nano dans l'eau, à température ambiante pendant 60 jours, ce qui entraîne une agglomération des particules).

La génotoxicité est évaluée par le test γ-H2AX, qui détecte les cassures double-brin de l'ADN, sur des cellules AL exposées à 10 µg/mL de nanoTiO$_2$ pendant 72h. Les auteurs indiquent qu'ils comptent les évènements génotoxiques à partir du nombre de cellules présentant au moins un focus de γ-H2AX, comme décrit dans une publication de référence, mais ne présentent que des images de microscopie à fluorescence montrant les foci. Les auteurs mesurent également le contenu cellulaire de γ-H2AX par western blot, et montrent une augmentation significative de ce contenu dans les cellules exposées aux nanoTiO$_2$, l'effet étant plus marqué avec les plus petites tailles de nano. A nouveau, il n'y a pas d'effet du vieillissement du nanoTiO$_2$ sur la génotoxicité.

Les auteurs examinent également les mutations du gène CD59 dans les cellules exposées à 10 µg/mL de nanoTiO$_2$ pendant 72h. Ils observent une augmentation statistiquement significative du nombre de mutants sur le locus CD59 parmi les cellules exposées aux nanoTiO$_2$, qu'elles soient pristines ou vieillies. Le profil de mutations est différent dans les cellules témoins (mutations spontanées) par rapport aux cellules exposées aux nanoTiO$_2$. En effet, les cellules exposées présentant une mutation de CD59 présentent également une

fréquence de mutation élevée dans 5 autres loci du chromosome 11, par rapport aux cellules témoins.

Enfin, les auteurs analysent le contenu intracellulaire en espèces réactives de l'oxygène et quelques marqueurs d'apoptose dans les cellules exposées, et relient la survenue de l'apoptose à la génotoxicité des nanoparticules.

La méthodologie employée dans cet article et complexe et n'est pas classique. Il s'agit d'un test de mutagénicité qui ne suit pas les lignes directrices de l'OCDE, mené sur une lignée hybride hamster-humain. Le poids de la preuve sera donc moins fort que dans les articles précédemment discutés. Le test du γ-H2AX est également critiquable, car les auteurs ne présentent pas de méthode quantitative pour évaluer la génotoxicité.

3.4.3.2. Génotoxicité *in vivo*

- **Tests des comètes *in vivo***

  - E171

Dans l'étude de Jensen *et al.* (2019), des rats ont été gavés pendant 10 semaines (1 fois par semaine) à des doses de 50 et 500 mg de E171 $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$. Des tests des comètes classique et modifié (à l'aide d'enzymes de réparation de l'ADN tel que la Fpg ou la hOGG1) n'ont révélé aucun dommage à l'ADN au niveau de cellules de foie et de poumons.

  - NanoTiO$_2$ compris entre 10-100 nm

Murugadoss *et al.* (2020) ont observé une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN sur les cellules sanguines (leucocytes) après une administration unique (présumé par le GT) de 2 types de TiO_2 (17 et 117 nm) par gavage chez la souris. Le manque de précisions relatives au protocole expérimental ne permet pas d'identifier clairement les niveaux de doses testés (environ 50 mg par souris). D'autres études se sont intéressées à l'administration répétée de nanoTiO$_2$ pour des durées d'exposition allant de 5 à 60 jours et pour des niveaux de doses allant de 5 à 1000 $(mg\ (kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ chez la souris. Une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN a été observée pour les cellules de la moelle osseuse (Sycheva *et al.* 2011), du foie (Sycheva *et al.* 2011 ; Shukla *et al.* 2014) et de l'estomac (Mohamed 2015).

Aucune augmentation statistiquement significative de fragmentation de l'ADN n'a été mise en évidence pour les cellules de foie et du sang chez le rat exposé 45 jours à 0,5 $(mg\ (kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ dans l'étude de Martins *et al.* (2017). De même, aucune augmentation de fragmentation de l'ADN dans des cellules de cerveau chez des souris exposées 7 jours à des doses de 40 et 200 $(mg\ (kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ n'a été observée dans l'étude de Sycheva *et al.* (2011).

  - NanoTiO$_2$ < 10 nm

Une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN a été observée pour les leucocytes du sang circulant chez des souris gavées 60 jours à des doses de

nanoTiO$_2$ (5-12 nm) variant de 50 à 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Grissa *et al.* 2015). Dans l'étude de Dekanski *et al.* (2018), aucune augmentation statistiquement significative de fragmentation de l'ADN sur cellules sanguines n'a été observée chez des souris gavées à des doses allant jusqu'à 2000 mg (kg pc)$^{-1}$ (la dose totale est administrée en 4 étapes espacées de 30 minutes).

Tableau 13. Résultats des tests des comètes *in vivo*

Articles	Nanomatériaux	Résultats	Commentaires du GT
Sycheva *et al.* (2011)	NanoTiO$_2$ de 33 nm (moyenne) ; anatase	Positif sur cellules de moelle osseuse et de foie	Résultats non validés car le GT note l'absence de données permettant d'exclure un effet cytotoxique.
		Négatif sur cellules de pré-estomac, cerveau et testicules	Résultat non validés car le GT note : l'absence de témoin positif ; 100 cellules analysées au lieu de 150 ; la dose maximale testée n'est pas justifiée, le prélèvement des organes est effectué 24h après la dernière administration au lieu des 2 à 6h recommandés, pas de preuve d'exposition des cellules.
Dekanski *et al.* (2018)	NanoTiO$_2$ de 4,5 nm ; anatase	Négatif sur cellules du sang	Résultats non validé car le GT note : seulement 2 doses testées, pas de preuve d'exposition des cellules, pas de mesure du % tail DNA.
Grissa *et al.* (2015)	NanoTiO$_2$ de 5-12 nm ; anatase	Positif sur cellules du sang	Résultats non validés car le GT note l'absence de données permettant d'exclure un effet cytotoxique.
Jensen *et al.* (2019)	E171 ; anatase	Négatif sur cellules de foie et poumons (avec ou sans Fpg)	Résultat non validé car le GT note : l'absence de témoin positif, administration sur 10 semaines mais seulement 1x/semaine permettant la réparation d'éventuels dommages, seulement 2 doses testées, la dose maximale testée n'est pas justifiée, pas de preuve d'exposition des cellules, le prélèvement des organes est effectué 24h après la dernière administration au lieu des 2 à 6h recommandés
Murugadoss *et al.* (2020)	2 nanoTiO$_2$ de 17 et 117 nm ; cristallinité ?	Positif sur cellules du sang avec les 2 nanoTiO$_2$	Résultat non validé car le GT note que les doses testées ne sont pas clairement explicitées.
Shukla *et al.* (2014)	NanoTiO$_2$ de 20-50 nm ; anatase	Positif sur cellules de foie (avec ou sans Fpg)	Le GT n'est pas en mesure de se positionner clairement sur de potentiels effets cytotoxiques : résultats contradictoires entre histopathologie (absence d'apoptose/nécrose) et les biomarqueurs sériques indiquant une probable altération des hépatocytes. Cependant

			l'augmentation des effets en présence de FpG pourrait souligner la présence de mécanismes autres que apoptose/nécrose.
Mohamed *et al.* 2015	NanoTiO$_2$ de 46 nm (moyenne) ; Rutile (78%) et anatase (22%)	Positif sur cellules de l'estomac	Résultats non validés car le GT note que les analyses montrent de la nécrose (histologie) et de l'apoptose (ADN en échelle)
Martins *et al.* (2017)	NanoTiO$_2$ de 42 nm (moyenne) ; cristallinité ?	Négatif sur cellules de foie et du sang	Résultats non validés car le GT note : absence de témoin positif ; le temps de prélèvement non précisé, la dose maximale testée est faible et non justifiée.

- **Tests des micronoyaux *in vivo***

  - E171

Aucun test des micronoyaux *in vivo* mené avec du E171 n'a été identifié par le GT.

  - NanoTiO$_2$ compris entre 10-100 nm

Dans l'étude de Shukla *et al.* (2014), les auteurs ont observé une augmentation de la fréquence des micronoyaux dans des cellules de moelle osseuse de souris exposées à la dose maximale de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 14 jours. A l'inverse, aucune augmentation statistiquement significative n'a été observée dans des cellules épithéliales de pré-estomac et de colon ni dans les érythrocytes et les spermatides de souris exposées durant 7 jours à des doses allant jusqu' à 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Sycheva *et al.* 2011).

  - Nano TiO$_2$ < 10 nm

Dans l'étude de Grissa *et al.* (2015), l'exposition de souris à des doses de 100 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 60 jours a entraîné une augmentation de la fréquence des micronoyaux dans les érythrocytes de la moelle osseuse.

Tableau 14. Résultats des tests des micronoyaux *in vivo*

Articles	Nanomatériaux	Résultats	Commentaires du GT
Shukla *et al.* (2014)	NanoTiO$_2$ de 20-50 nm ; anatase	Positif sur cellules de moelle osseuse	Résultats validés
Sycheva *et al.* (2011)	NanoTiO$_2$ de 33 nm (moyenne) ; anatase	Négatif sur cellules de l'estomac, du colon, de la moelle osseuse et spermatides	Résultats non validés car : pas de données sur le taux de prolifération cellulaire, 1000 érythrocytes analysés au lieu de 4000.
Grissa *et al.* (2015)	NanoTiO$_2$ de 5-12 nm ; anatase	Positif sur cellules de moelle osseuse	Résultats non validés car : pas de témoin positif et fréquence de micronoyau très élevée (interférence possible des granules de mastocytes)

Conclusions sur la génotoxicité

En 2018, Charles *et al.* ont publié une revue de la littérature relative à la génotoxicité *in vitro* des nanoparticules de TiO_2. Les données collectées, principalement issues de test des comètes et des micronoyaux, soulignent des résultats contradictoires avec environ 60% des tests de génotoxicité *in vitro* conduisant à des résultats positifs (i.e. montrant un potentiel effet génotoxique). Selon cette étude, la variabilité des résultats pourrait provenir : de la diversité des TiO_2 testés, de leur stabilité en solution, des effets photo-catalytiques du TiO_2 après exposition à la lumière, de la durée d'exposition ainsi que du choix de la lignée cellulaire.

A la suite de cette revue, le GT a collecté des données de génotoxicité *in vitro* entre 2019 en 2021. Les tests de mutations géniques (limités à seulement 2 études), menés avec du nanoTiO_2 sur la base des lignes directrices de l'OCDE, donnent des résultats négatifs (c'est-à-dire absence de potentiel mutagène). Des tests des micronoyaux (limités à seulement 3 études) menés sur la base des lignes directrices de l'OCDE, indiquent l'absence d'effets clastogènes et/ou aneugènes du nanoTiO_2. Enfin, la majorité des études utilisant le test des comètes souligne la fragmentation de l'ADN après exposition aux nanoTiO_2.

Le GT n'est pas en mesure de valider les résultats des tests de mutations géniques *in vitro* et des micronoyaux *in vitro* du fait du non-respect des critères de validité des études tels qu'ils sont formulés dans les lignes directrices. Le test des comètes *in vitro* ne possède pas de ligne directrice de l'OCDE ce qui conduit à la mise en place de protocoles variés et non reproductibles d'une étude à l'autre. Bien que les résultats obtenus dans la littérature indiquent majoritairement des résultats positifs, la fragmentation de l'ADN, du fait de la présence de mécanismes de réparation, peut évoluer au cours du temps (pour les études *in vitro* et *in vivo*). Ce test peut toutefois être utile à mettre en œuvre *in vitro*, à des fins mécanistiques en particulier si les résultats préalables de toxicité *in vitro* ont montré un effet « stress oxydant » des nanomatériaux.

Les études de génotoxicité *in vivo* indiquent des résultats hétérogènes pour les tests des comètes (3 études donnant des résultats positifs et 2 études donnant des résultats négatifs) et des micronoyaux (2 études positives et une négative). Concernant le test des comètes *in vivo*, des résultats positifs ont été observés chez la souris pour des temps d'exposition courts (dès 5 jours) et longs (60 jours). Les résultats positifs des micronoyaux ont été observés à partir de 14 jours ainsi que pour des temps d'exposition plus longs (60 jours).

Une seule étude *in vivo*, identifiée comme pertinente et pour laquelle le GT n'a pas identifié de limitations méthodologiques, souligne la capacité du nanoTiO_2 à générer des micronoyaux au niveau de la moelle osseuse. Le GT n'a pas été en mesure de valider les conclusions des autres études *in vivo* du fait des limitations méthodologiques identifiées. De plus, les études de génotoxicité *in vivo* n'ont pas pris en compte les organes primo exposés (intestin, colon) dans l'optique d'évaluer des effets potentiels au niveau local.

Bien que le GT ait identifié une étude pertinente du micronoyau *in vivo* présentant un résultat positif, le GT n'est pas en mesure de conclure sur la génotoxicité du nanoTiO_2 du fait de l'ensemble des résultats contradictoires et des incertitudes identifiées (issus de tests des comètes (*vitro* et *vivo*) et du micronoyau (*vitro* et *vivo*) non validés par le GT). Le GT recommande la mise en place d'études de génotoxicité considérant les particularités de la nano-échelle (détails en section 3.5.4).

3.4.4. Toxicologie générale

3.4.4.1. Etudes conduites selon les lignes directrices de l'OCDE

- **<u>Etudes de toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours</u>**

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

- <u>E171</u>

Aucune étude de toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours menée avec du E171 n'a été identifiée par le GT.

- <u>TiO_2 compris entre 10 et 100 nm</u>

Dans l'étude de Heo *et al.* (2020), des rats (15 par sexe et par groupe) ont été exposés par gavage à du nanoTiO_2 (P25, 21 nm) à des doses de 250, 500 et 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ pendant 90 jours. Une période de récupération de 28 jours a été mise en place 24h après le dernier traitement afin de vérifier la persistance des potentiels effets néfastes en l'absence de traitement. D'après les auteurs, cette étude n'a mis en évidence aucun effet toxicologique spécifique associé au P25 jusqu'à la dose maximale testée de 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$. Des variations de paramètres en lien avec l'hématologie, la biochimie sérique et l'histopathologie ont néanmoins été relevées mais n'ont pas été attribuées au traitement par le nanoTiO_2 (effets transitoires, pas de relation dose-effet, effet réversible, lésions histologiques isolées et spontanées chez les témoins). La même étude menée sur une période de 28 jours n'a pas mis en évidence d'effets toxicologiques liés au traitement par le nanoTiO_2.

Dans l'étude de Warheit *et al.* (2015), des rats (10 par sexe et par groupe) ont été exposés par gavage à du TiO_2 de 145 nm (21% en nombre de particules < 100 nm) recouvert d'alumine à des doses de 100, 300 et 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ pendant 90 jours. De même que pour l'étude de Heo *et al.* (2020), aucun effet toxicologique spécifique associé au nanoTiO_2 recouvert d'alumine n'a été mis en évidence jusqu'à la dose maximale testée de 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$. Des variations du poids de certains organes et de paramètres biochimiques ont été observés mais considérés comme non significatifs du fait de l'absence d'effet dose-réponse. Toujours dans cette même étude, une étude de 28 jours utilisant un TiO_2 de 173 nm (11% en nombre de particules < 100 nm) et une étude de toxicité aiguë utilisant un TiO_2 de 73 nm (73% de particules < 100 nm) recouvert d'alumine et de silice n'ont entraîné aucun effet néfaste.

- TiO_2 < 10 nm

Aucune étude de toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours menée avec du nanoTiO_2 < 10 nm n'a été identifiée par le GT.

Conclusions sur les études conduites selon les lignes directrices de l'OCDE pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours

Les 2 études de toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours identifiées par le GT ont permis de déterminer une dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) de 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour 2 nanoTiO_2 de tailles différentes. Le GT souligne que l'une de ces études repose sur l'utilisation d'un TiO_2 recouvert d'alumine (Warheit *et al.* 2015). Selon le GT, ces 2 études ont été menées rigoureusement, cependant elles ne sont pas suffisantes pour valider et considérer cette seule NOAEL comme point de référence toxicologique dans le cadre d'une évaluation des risques (ERS) nanospécifique du nanoTiO_2. En effet, dans son guide méthodologique d'ERS nanospécifique, le GT a établi le suivi de paramètres additionnels dans le cadre d'une étude subchronique de 90 jours tels que la recherche de biomarqueurs précancéreux au niveau du tractus gastro intestinal ainsi que des éléments de réponse immunitaire telle que la fréquence des cellules Treg. Certaines études non OCDE se sont intéressées à ces paramètres (voir section suivante). Dans ce contexte, le GT recommande la mise en place d'une étude pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours selon la ligne directrice 408 de l'OCDE afin de déterminer un point de repère toxicologique à partir d'un mélange de nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171 (détails en section 3.5.4).

3.4.4.2. Etudes ne suivant pas de lignes directrices de l'OCDE

- **Biomarqueurs précancéreux**

- E171

Dans l'étude de Bettini *et al.* (2017), les auteurs se sont intéressés à l'initiation et la promotion de lésions précancéreuses (foyers de cryptes aberrantes, FCA) chez des rats exposés pendant 100 jours, à une dose de 0,2 et 10 mg de E171 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} dans l'eau de boisson. Les conclusions en lien avec cette étude reprennent les conclusions de l'avis de Anses de 2017. Afin d'étudier l'impact du E171 sur la promotion de FCA, des rats 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. A la fin de la période d'exposition, les animaux sont sacrifiés, les côlons sont prélevés et examinés en aveugle pour la recherche cytologique des anomalies de la muqueuse colique par une coloration classique au bleu de méthylène. Les auteurs n'ont pas observé d'augmentation significative du nombre total de FCA par côlon aux deux doses testées par rapport au groupe témoin. 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 la capacité du E171 à initier l'apparition spontanée de FCA, des rats ont été exposés à 10 mg de E171 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 100 jours sans prétraitement à la DMH. Quatre rats sur 11 présentaient des foyers de cryptes aberrantes

dans le côlon, alors qu'aucun des 12 rats du groupe témoin 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.

Dans l'étude de Blevins *et al.* (2019), des rats ont été exposés à du E171 à des niveaux de doses de 40, 400 et 5000 mg kg^{-1} dans les aliments ce qui correspond à des niveaux d'exposition de 3,9 ; 25,5 et 294 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$. Ces niveaux d'exposition fluctuent selon le groupe traité et au cours du temps. Les auteurs relèvent une augmentation statistiquement significative du nombre de FCA et du nombre de cryptes aberrantes par foyer (ABC) chez les rats traités uniquement avec de la DMH à 180 mg $(kg\ pc)^{-1}$. Ce résultat est logique et attendu car la DMH est utilisée pour initier les processus de cancérogenèse. Les auteurs ne relèvent pas d'augmentation statistiquement significative du nombre de FCA ni du nombre de cryptes aberrantes par foyer au niveau du côlon de rats exposés au E171 et préalablement traités avec de la DMH à 180 mg $(kg\ pc)^{-1}$. De même, les auteurs ne relèvent pas de différences chez les rats exposés uniquement au E171 et concluent à l'absence d'initiation et de promotion de lésions précancéreuses liées à l'exposition de rats au E171. Les auteurs indiquent qu'une partie du colon n'était pas observable suite à un problème lors de la fixation des tissus.

Dans le cadre d'une étude EOGRTS transmise à l'EFSA lors de la réévaluation du E171 (EFSA 2021), un groupe d'animaux satellite a été utilisé pour étudier l'effet du E171 sur l'apparition potentielle de FCA sans initiation préalable. Des rats ont été exposés durant 10 semaines à des doses de 100, 300 et 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ dans les aliments. Aucune augmentation de FCA n'a été observée chez les animaux traités par rapport au groupe témoin. Le panel d'experts de l'EFSA a noté l'absence d'un témoin positif dans le protocole d'étude. Il a conclu à l'absence de potentiel initiateur chez le rat exposé à une dose de 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$.

- <u>NanoTiO_2 compris entre 10-100 nm</u>

Aucune étude sur les biomarqueurs précancéreux menée avec du nanoTiO_2 compris entre 10 et 100 nm n'a été identifiée par le GT.

- <u>NanoTiO_2 < 10 nm</u>

Aucune étude sur les biomarqueurs précancéreux menée avec du nanoTiO_2 < 10 nm n'a été identifiée par le GT.

<u>Conclusions sur les biomarqueurs précancéreux</u>

Les études de Bettini *et al.* (2017) et Blevins *et al.* (2019) montrent des résultats contradictoires après exposition de rats au E171 pendant 100 jours à des niveaux de doses comparables. Néanmoins, le mode d'administration différent (dans l'eau de boisson dans l'étude de Bettini *et al.* (2017) ou dans les aliments dans l'étude de Blevins *et al.* (2019)) pourrait expliquer ces divergences. Le GT note que dans l'étude de Blevins *et al.* (2019), les auteurs indiquent une limitation méthodologique pour l'analyse des FCA réalisée seulement sur une partie de l'épithélium du colon en raison d'une autolyse liée à la fixation des tissus. Dans son avis de 2017 (Anses 2017), l'Anses avait identifié une étude menée chez la souris exposée pendant 10 semaines à du E171 à une dose de 5 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ rapportant un potentiel effet promoteur (augmentation du nombre de tumeurs au niveau du côlon) après initiation de la cancérogenèse

par l'azoxyméthane (accompagné d'un traitement au dextran sulfate de sodium induisant une colite). Cette même étude n'a pas rapporté d'effet initiateur du E171 (Urrutia-Ortega *et al.* 2016).

Au vu de ces résultats, le GT n'est pas en mesure d'exclure le potentiel effet promoteur du E171 au niveau du côlon. D'autres études devraient être mises en œuvre pour confirmer les effets de promotion et d'initiation du nanoTiO_2. Dans son guide méthodologique d'ERS nanospécifique, l'Anses a préconisé la recherche de 2 biomarqueurs précancéreux (FCA et MDF (foyers appauvris en mucine)) parmi les critères justifiant la mise en place d'une étude de cancérogenèse. Les études sélectionnées par le GT se sont focalisées sur les FCA. Néanmoins, la mise en place d'études additionnelles relatives à ces biomarqueurs n'est pas nécessaire dans le cadre de cette évaluation du risque car d'autres critères, tels que l'accumulation de nanoTiO_2 dans des organes systémiques et reproducteurs mis en évidence dans les études de toxicocinétique, justifient à eux seuls la réalisation d'une étude de cancérogenèse.

- **Barrière intestinale**

  - E171

L'exposition de rats par gavage à la dose de 500 mg de E 171 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} provoque une diminution de l'expression génique d'une protéine des jonctions serrées (TJP1) au niveau du côlon. Aucun effet sur le niveau d'expression d'une autre protéine des jonctions serrées (l'occludine) n'a été observé (Jensen *et al.* 2019). L'étude de Cao *et al.* (2020) a mis en évidence des altérations tissulaires caractérisées par une diminution modérée de la fréquence des cellules à mucus (Goblet cells) et du nombre de cryptes uniquement chez des souris obèses exposées à du E171 à une dose de 0,1% (masse) dans l'aliment pendant 56 jours. Cet effet est plus prononcé chez des souris exposées à du nanoTiO_2 de 33 nm. L'exposition de souris à une dose unique de 40 mg de E171 (kg pc)$^{-1}$ (1 administration) par gavage (Coméra *et al.* 2020) ou dans l'eau de boisson à des doses de 2, 10 et 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 28 jours (Pinget *et al.* 2019) n'a pas entraîné de modifications relatives à : la résistance transépithéliale, l'expression des gènes Tjp1 codant pour des protéines de jonctions serrées, la perméabilité paracellulaire. Concernant la composition du mucus, l'étude de Talbot *et al.* (2018) indique que la composition du contenu caecal en acide gras à chaîne courte est peu modifiée. 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 à des doses de 0, 1 et 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} de E171 ou de P25 (21 nm). L'étude de Pinget *et al.* (2019) souligne la diminution de l'expression du gène Muc2 impliqué dans la synthèse de mucines mais ne confirme pas l'altération potentielle du mucus après l'observation d'autres marqueurs.

  - NanoTiO_2 compris entre 10-100 nm

Différentes études ont montré que l'exposition de rats et de souris à des particules de TiO_2 dont la taille est comprise entre 10 et 100 nm a entraîné des atteintes histologiques de l'épithélium intestinal. Une augmentation de la taille des villosités chez des rats exposés par gavage à 2 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 5 jours (Ammendolia *et al.* 2017) ainsi qu'une augmentation du ratio hauteur des villosités/profondeur des cryptes chez des souris exposées à 10 mg (kg

pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 1 à 6 mois (Zhang *et al.* 2021) ont été observées. A l'inverse, une réduction de la taille des villosités a été rapportée après exposition par gavage de rats à des doses variant de 2 à 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 30 jours (Gao *et al.* 2020) ou de souris exposées à des doses variant de 300 à 1200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 28 jours (Yao *et al.* 2020). Des villosités plus éparses, une perte de cryptes et des dommages de l'épithélium au niveau de l'iléon ont également été observées dans les études de Gao *et al.* (2020) et Yao *et al.* (2020). L'étude de Cao *et al.* (2020) a mis en évidence des altérations tissulaires caractérisées par une diminution de la fréquence des cellules à mucus (Goblet cells) et du nombre de cryptes chez des souris obèses et non obèses exposées à des particules de TiO_2 à une dose de 0,1% (m) pendant 56 jours.

Des modifications de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de protéines des jonctions serrées ont également été observées. Les jonctions serrées jouent un rôle essentiel dans l'intégrité et la perméabilité de l'intestin. Une augmentation de l'expression des gènes codant des protéines de jonctions serrées intestinales a été observée chez des souris exposées pendant 1 mois à des doses de 10 (Zhang *et al.* 2021) et de 1200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Yao *et al.* 2020). Yao *et al.* (2020) ont également mis en évidence une dérégulation des gènes impliqués dans la différenciation des cellules T en Th2 chez des souris exposées à des doses de 300 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 15 jours. Selon les auteurs, les cytokines sécrétées par des cellules Th2 pourraient conduire à la dégradation des jonctions serrées de l'intestin.

La perméabilité de l'intestin a également été évaluée dans les études de Zhang *et al.* (2021) et de Gao *et al.* (2020). L'exposition de souris à des nanoparticules de TiO_2 à une dose de 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 6 mois suivie d'une exposition à des lipopolysaccharides (LPS) a entraîné une diminution de la perméabilité. Cette diminution n'est pas observée après exposition avec du TiO_2 seul ou des LPS seul. Les LPS étant connus pour entraîner des réponses inflammatoires et délétères au niveau de la barrière intestinale, l'absence de modification de perméabilité intestinale dans le groupe LPS seul est un résultat surprenant (Zhang *et al.* 2021). Des modifications de l'absorption de certains acides aminés ont été identifiées après 30 jours d'exposition de rats à des nanoparticules de TiO_2 uniquement à la plus faible dose de 2 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}, l'absorption de certains métaux (Mg, Mn, Zn) n'étant pas altérée (Gao *et al.* 2020). Une diminution de la perméabilité intestinale a également été observée chez des rats adultes exposés à des doses variant de 10 à 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 30 jours (Wang *et al.* 2013).

- <u>NanoTiO_2 < 10 nm</u>

Aucune étude relative à la barrière intestinale menée avec du nanoTiO_2 < 10 nm n'a été identifiée.

<u>Conclusions sur la barrière intestinale</u>

Les quelques études menées avec le E171 montrent des résultats contradictoires concernant les propriétés cohésives de la barrière épithéliale, de légères altérations tissulaires (chez des souris obèses) et l'absence d'altération des fonctions protectrices du mucus. Les études menées avec des nanoparticules de TiO_2 dont la taille est comprise entre 10 et 100 nm ont mis en évidence : des atteintes histologiques au niveau intestinal, une dérégulation de gènes impliqués dans la cohésion de l'épithélium intestinal, une diminution de la fréquence des

cellules à mucus ainsi qu'une modification de la fonction de perméabilité constatée pour certaines substances.

Le GT a identifié plusieurs limitations au sein de ces études telles que : des durées d'exposition trop faibles pour mettre en évidence des effets à long terme (Comera *et al.* 2020, Talbot *et al.* 2018, Ammendolia *et al.* 2018, Lamel *et al.* 2019) ; un nombre d'animaux limité (Comera *et al.* 2020, Yao *et al.* 2020) ; des incohérences et l'absence de corrélation entre les paramètres mesurés (Zhang *et al.* 2021) ; des données statistiques peu robustes (Gao *et al.* 2020).

Ces limitations conduisent à des incertitudes quant à l'interprétation et l'exploitation de ces résultats dans le cadre d'une évaluation du risque. Néanmoins, le GT relève des atteintes histologiques et des dégradations fonctionnelles de la barrière intestinale notamment dans les études utilisant des particules de TiO_2 dont la taille est comprise entre 10 et 100 nm. Ces effets potentiels doivent être confirmés à l'aide d'une étude conduite selon la ligne directrice 408 de l'OCDE pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours à partir d'un mélange de nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171 (détails en section 3.5.4).

- **Immunotoxicité**

  - E171

Les études menées avec du E171 ont mis en évidence des altérations moléculaires (cytokines) suggérant des réponses inflammatoires chez le rat et la souris. Une modification des niveaux de cytokines circulantes et une augmentation des ions superoxydes ont été observées chez des souris exposées pendant 15 jours (3 jours/semaine) à une dose de 5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Talamini *et al.* 2019). Des augmentations des niveaux de cytokines pro et anti-inflammatoires au niveau du côlon ont également été observées après exposition de rats à une dose de 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 100 jours (Bettini *et al.* 2017) et chez des souris (de manière dose dépendante) à partir de 2 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 28 jours (Pinget *et al.* 2019).

Des altérations cellulaires ont également été rapportées chez des souris avec une augmentation de l'infiltration de monocytes, de macrophages et de lymphocytes CD8+ au niveau du foie et de l'intestin dans l'étude de Talamini *et al.* (2019) et du côlon dans l'étude de Pinget *et al.* (2019). Une augmentation de la fréquence des cellules dendritiques et une diminution de la fréquence des lymphocytes Treg et Th ont été observées dans les plaques de Peyer chez le rat exposé à du E171 et des nanoTiO_2 de 25 nm (NM105) à une dose de 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} après 7 jours. Après 100 jours d'exposition à la même dose, le niveau des cellules dendritiques n'est pas modifié alors que la diminution des Treg et des Th est de nouveau observée (Bettini *et al.* 2017). Enfin, une augmentation de l'expression des gènes codant une cytokine pro-inflammatoire (IL-1B) au niveau du foie et de l'estomac est observée dans l'étude de Talamini *et al.* (2019). Dans l'étude de Blevins *et al.* (2019), aucune altération cellulaire (fréquence des cellules dendritiques, des lymphocytes Th et Treg au niveau du sang, des plaques de Peyer et de la rate) ni moléculaire (taux de cytokines dans le sang, le côlon et l'intestin) n'a été observée chez des souris exposées pendant 100 jours à des doses de E171 variant de 40 à 5000 mg kg^{-1} (de 3,9 à 294 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}) dans l'alimentation.

  - NanoTiO_2 compris entre 10-100 nm

Une augmentation de l'infiltration de cellules dendritiques et de macrophages au niveau du côlon a été observée chez des souris obèses après 56 jours d'exposition à un niveau de dose de 0,1% (masse TiO_2 / masse d'aliment) (Cao *et al.* 2020).

Des modulations des niveaux de cytokines (augmentation ou diminution selon les cytokines) ont été observées chez des souris exposées pendant 56 jours à une dose de 0,1% (en masse dans l'aliment) (Cao *et al.* 2020) ou pendant 6 mois à une dose de 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Hu *et al.* 2018). Dans l'étude de Wang *et al.* (2013), l'exposition de rats par gavage pendant 30 jours à des doses de 10, 50 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ a entraîné une augmentation du nombre de mastocytes au niveau de l'estomac (pas de modification au niveau intestinal) sans modifier le niveau sérique d'histamine et d'IgE. L'exposition de souris à 2 types de nanoTiO_2 (33 et 124 nm) à une dose de 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 6 mois n'a pas entraîné de lésions tissulaires, d'infiltrations cellulaires ni de modifications des niveaux de cytokines dans l'étude de Zhang *et al.* (2021).

Une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation pro-inflammatoire est observée chez des rats gavés pendant 14 jours à une dose de 500 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Mohammed *et al.* 2020).

- <u>NanoTiO_2 < 10 nm</u>

L'étude de Hong *et al.* (2014) a mis en évidence une dérégulation de l'expression des gènes codant différentes cytokines ainsi qu'une augmentation de la concentration sérique de différentes interleukines chez des souris exposées pendant 6 mois à des doses variant de 2,5 à 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}.

<u>Conclusions sur l'immunotoxicité</u>

Différentes études ont souligné des altérations moléculaires et cellulaires suggérant des réponses inflammatoires au niveau du tractus gastro-intestinal et du foie de rats et de souris exposés au E171 ou à différentes formes de nanoTiO_2. Néanmoins, les variations de certains paramètres, bien que statistiquement significatives, restent faibles et semblent refléter une inflammation modérée (Bettini *et al.* 2017, Pinget *et al.* 2019). Le GT note cependant plusieurs effets potentiels issus d'exposition à court (7 jours) ou long terme (6 mois) pouvant suggérer une déficience de l'homéostasie immunitaire. Le GT a identifié au sein de ces études différentes limitations notamment : la mise en place d'un schéma de traitement non conventionnel (Talamini *et al.* 2019), l'absence de certains résultats (Hu *et al.* 2018) ou encore des incohérences en lien avec le nombre d'animaux traités (Hong *et al.* 2014). Dans ce contexte, le GT recommande de confirmer les altérations moléculaires (modulation des cytokines) et cellulaires (infiltration, modulation de la fréquence des lymphocyte T (notamment les Treg)) à l'aide d'une étude conduite selon la ligne directrice 408 de l'OCDE pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours à partir d'un mélange de nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171 (détails en section 3.5.4).

- **<u>Hépatotoxicité</u>**

- <u>E171</u>

Aucune étude d'hépatotoxicité menée avec du E171 n'a été identifiée par le GT

- <u>NanoTiO$_2$ compris entre 10 et 100 nm</u>

Des altérations histologiques ont été observées chez le rat et la souris suite à une exposition au nanoTiO$_2$ dont la taille des particules est comprise entre 10 et 100 nm. Une augmentation du poids relatif du foie a été observée chez des souris gavées pendant 15 jours à une dose de 150 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Abdelazim *et al.* 2015). Une désorganisation et une dégénérescence des hépatocytes ont été observées chez des rats gavés pendant 7 jours à une dose de 150 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Nie *et al.* 2021). Dans l'étude de Moradi *et al.* (2019), des rats gavés pendant 14 jours à une dose de 300 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} ont développé une dilatation de la veine porte, une hypertrophie des cellules de Kuppfer et une dégradation des hépatocytes conduisant à des œdèmes et des nécroses. Les mêmes types d'effets ont été observés chez des rats gavés pendant 14 jours à 500 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} avec une congestion et une dilatation de la veine centrale du foie, l'apparition de vaisseaux sanguins congestionnés, une dégradation des hépatocytes et l'apparition d'un grand nombre de cellules de Kupffer (Mohammed *et al.* 2020). La présence d'œdèmes, une dégénérescence hydropique avec vacuolisation, un désordre des travées hépatiques, ainsi que le gonflement des cellules périlobulaires sont observés chez des rats gavés pendant 30 jours à des doses variant de 10 à 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Une fibrose hépatique sévère avec infiltration massive de fibres de collagène est mentionnée dans l'étude d'Abdelazim *et al.* (2015). Une accumulation de cellules mononucléaires à proximité des sinusoïdes et des dilatations anormales de vaisseaux sanguins sont observés chez des souris à des doses de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 14 jours.

Des modulations de différents paramètres sériques (ALT, AST, ALP, LDH, bilirubine, albumine, protéines totales, etc.) pouvant traduire une altération hépatique ont été mesurées dans différentes études (Moradi *et al.* 2019, Nie *et al.* 2021, Mohammed *et al.* 2020, Wang *et al.* 2013, Abdelazim *et al.* 2015, Shukla *et al.* 2014).

Des augmentations des niveaux de malondialdéhyde dans les cellules hépatiques et d'espèces réactives de l'oxygène ont été observées chez des souris traitées aux doses de 50 et 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 14 jours (Shukla *et al.* 2014).

Un changement significatif dans l'expression des protéines de stress, des protéines suppressives de tumeurs et des protéines pro- et anti-apoptotiques est observé chez des souris exposés pendant 14 jours à des doses variant de 10 à 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Shukla *et al.* 2014).

Des modulations de biomarqueurs et de l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant (Nie *et al.* 2021, Moradi *et al.* 2019, Abdelazim *et al.* 2015, Mohammed *et al.* 2020) ont été observés.

- <u>NanoTiO$_2$ < 10 nm</u>

Dans l'étude de Dekanski *et al.* (2018), l'administration à des souris de nanoTiO$_2$ à une dose de 1000 ou 2000 mg (kg pc)$^{-1}$ (dose totale administrée en 4 fois sur 1 journée) a entraîné une augmentation du poids relatif du foie, un gonflement des hépatocytes, des boursouflures des vacuoles et une dilatation de la veine centrale. L'apoptose d'hépatocytes a également été observée chez des souris gavées pendant 6 mois à des doses variant de 2,5 à 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Hong *et al.* 2014). Des dysfonctionnements hépatiques, révélés par une augmentation du

niveaux sérique d'enzymes hépatiques ont été mis en évidence dans ces 2 études. Enfin, des infiltrations de leucocytes au niveau du foie (Dekanski *et al.* 2018), des variations de l'expression de gènes impliqués dans des processus immunitaires ainsi que des modulations des teneurs en interleukines reflèteraient une inflammation hépatique (Hong *et al.* 2014).

Conclusions sur l'hépatotoxicité

Les différentes études sélectionnées rapportent une altération du foie chez le rat et la souris pour des niveaux de doses variant de 2,5 à 2000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} et pour des durées de traitement allant de 1 jour à 6 mois. L'augmentation des teneurs sériques en enzymes hépatiques est observée quasi systématiquement dans les études sélectionnées et reflète une perte de l'intégrité membranaire des hépatocytes et une fuite du contenu cellulaire. Les effets observés se manifestent par des altérations histologiques, des processus inflammatoires et des dysfonctionnements hépatiques. Le GT a identifié plusieurs limitations dans ces études notamment l'absence d'approche quantitative (scoring) pour les études histologiques (Nie *et al.* 2021, Moradi *et al.* 2019, Abdelazim *et al.* 2015, Wang *et al.* 2013, Mohammed *et al.* 2020) ainsi que des schémas de traitement proposant une seule dose (Nie *et al.* 2021, Moradi *et al.* 2019, Abdelazim *et al.* 2015, Mohammed *et al.* 2020) et un mode d'administration non conventionnel (Dekanski *et al.* 2018). Dans ce contexte, Le GT recommande de confirmer les effets potentiels observés au niveau du foie à l'aide d'une étude conduite selon la ligne directrice 408 de l'OCDE pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours à partir d'un mélange de nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171 (détails en section 3.5.4).

- **Néphrotoxicité**

  - E171

Aucune étude de néphrotoxicité menée avec du E171 n'a été identifiée par le GT.

  - NanoTiO_2 compris entre 10 et 100 nm

Aucune augmentation du poids relatif du rein n'a été observée chez des rats gavés avec du nanoTiO_2 pendant 30 jours à des doses variant de 10 à 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} dans l'étude de Wang *et al.* (2013). Cependant, une diminution de la teneur en azote dans le sang suggère une légère altération du rein chez les adultes qui n'a pas été observée chez les jeunes rats. Une augmentation significative du nombre de cellules nécrotiques a été observée au niveau de glandes surrénales chez des rats gavés pendant 5 jours à une dose de 2 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (Tassinari *et al.* 2014).

  - NanoTiO_2 < 10 nm

Aucune étude de néphrotoxicité menée avec du nanoTiO_2 < 10 nm n'a été identifiée par le GT.

Conclusions sur la néphrotoxicité

Le faible nombre d'études rapportant des observations sur cet organe ne permet pas au GT de conclure sur l'apparition d'effets néfastes, cependant il note des altérations au niveau du rein et des glandes surrénales qui nécessitent d'être confirmées à l'aide d'une étude conduite

selon la ligne directrice 408 de l'OCDE pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours à partir d'un mélange de nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171 (détails en section 3.4.5).

- **Système cardiovasculaire**

  - E171

Dans l'étude de Jensen *et al.* (2018), les auteurs ont exploré les effets sur le système cardiovasculaire 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 pc)$^{-1}$). 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 oxydant. Le E171 (à des doses de 500 mg (kg pc)$^{-1}$) 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 oxydant (ascorbate, malondialdéhyde, tétra hydrobioptérine marqueur de l'activation de la voie eNOS et diméthylarginine) n'a été observée entre les groupes témoins et traités.

  - NanoTiO_2 compris entre 10 et 100 nm

Dans l'étude de Wang *et al.* (2013), une diminution du poids relatif du cœur ainsi qu'une diminution des teneurs sériques en enzyme CK et HBDH ont été rapportées chez des rats jeunes (3 semaines) exposés pendant 30 jours à partir d'une dose de 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Ces modulations n'ont pas été observées chez les adultes (8 semaines).

  - NanoTiO_2 < 10 nm

Aucune étude relative au système cardiovasculaire menée avec du nanoTiO_2 < 10 nm n'a été identifiée par le GT.

Conclusions sur le système cardiovasculaire

Les effets vasculaires mis en évidence dans l'étude de Jensen *et al.* (2018) 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. Dans l'étude de Wang *et al.* (2013), les modulations observées avec du nanoTiO_2 pourraient refléter une altération des fonctions cardiaques et semblent affecter uniquement les sujets jeunes (3 semaines). En 2019, l'Anses avait souligné que ces résultats corroborent l'altération de la microcirculation vasculaire et les effets cardiaques rapportés chez les rongeurs après inhalation de nanoparticules de TiO_2 (Nurkiewicz *et al.* 2008, Kan *et al.* 2012 et 2014) ou après administration intratrachéale (Savi *et al.* 2014). Le GT recommande de confirmer les effets potentiels observés au niveau du système cardiovasculaire à l'aide d'une étude conduite selon la ligne directrice 408 de l'OCDE pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours à partir d'un mélange de nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171 (détails en section 3.5.4).

- **Biochimie et hématologie**

- E171

Aucune étude en lien avec la biochimie et l'hématologie menée avec du E171 n'a été identifiée par le GT.

- $NanoTiO_2$ compris entre 10 et 100 nm

Différentes études issues de la même équipe (Hu *et al.* 2015, 2016, 2018 et 2019) se sont intéressées aux effets du $nanoTiO_2$ sur le niveau de glucose sérique chez la souris. L'exposition par gavage à des doses variant de 50 à 320 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ pour des durées de traitement variant de 14 jours à 6 mois a entraîné une augmentation du taux de glucose. Selon les auteurs, la production de ROS liée à un stress du réticulum endoplasmique au niveau du foie entraînerait une résistance à l'insuline provoquant ainsi une augmentation du taux de glucose. Les mêmes études notent l'absence d'une modulation du taux d'insuline ainsi que l'absence d'apoptose des cellules β du pancréas.

Dans l'étude de Gao *et al.* (2020), l'exposition de rats par gavage à 2 types de $nanoTiO_2$ (25 et 120 nm en moyenne) à des doses variant de 2 à 50 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ pendant 30 jours n'a pas entraîné de modifications du taux de glucose mais a cependant entraîné une augmentation de la consommation (ex : acides aminés, glucose) et une diminution de la synthèse de certains nutriments (ex : urée, cystathionine). Ces effets sont plus prononcés avec le $nanoTiO_2$ de plus petite taille (pas d'effet dose/réponse).

- $NanoTiO_2 < 10$ nm

L'exposition de rats gavés pendant 60 jours à des doses variant de 50 à 200 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ (Grissa *et al.* 2015) a entraîné une réduction du nombre d'hématies, de l'hématocrite, du taux d'hémoglobine et du volume corpusculaire moyen. Ces modulations correspondraient à une anémie macrocytaire. L'augmentation des plaquettes et du volume plaquettaire moyen suggère un effet possible sur la coagulation sanguine. L'augmentation des leucocytes pourrait indiquer l'activation des systèmes de défense immunitaire de l'organisme. L'exposition de rat à une dose de 100 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ pendant 60 jours (Grissa *et al.* 2017) entraîne l'augmentation du taux de glucose, du cholestérol et des triglycérides ainsi qu'une modulation de marqueurs du stress oxydant (catalase, superoxyde dismutase).

Conclusions sur les paramètres biochimiques et hématologiques

Plusieurs études convergent vers un impact potentiel du $nanoTiO_2$ sur le niveau de glucose sanguin qui résulterait d'un stress au niveau du réticulum endoplasmique. D'autres modulations hématologiques et biochimiques ont également été observées dans un nombre plus limités d'études. Le GT a identifié plusieurs limitations méthodologiques au sein de ces études : le mode d'administration et le nombre d'animaux testés ne sont pas précisés (Hu *et al.* 2015), les résultats pour certaines doses ne sont pas présentés (Hu *et al.* 2018), une seule dose est considérée dans le schéma de traitement (Hu *et al.* 2019, Grissa *et al.* 2017). Le GT recommande de confirmer les modulations biochimiques et hématologiques à l'aide d'une étude conduite selon la ligne directrice 408 de l'OCDE pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours à partir d'un mélange de $nanoTiO_2$ représentatif de la fraction nanométrique du E171 (détails en section 3.5.4).

- **Microbiote**

Cao *et al.* (2020) ont étudié les effets du E171 et d'un nanoTiO_2 sur le microbiote de souris exposées, à des doses de 0,1% (masse dans l'aliment) pendant 8 semaines. Les auteurs ont mis en évidence une modification (dysbiose) de la composition du microbiote, cette dysbiose étant plus marquée chez les souris obèses exposées au nanoTiO_2. Une diminution de la production d'acides gras à chaînes courtes (activité métabolique du microbiote) est également observée et plus marquée chez les souris obèses exposées au E171. Enfin, les études de transfert de flore depuis les souris traitées au TiO_2 (nano ou E171) selon un régime obésogène, vers des receveuses saines (*i.e.,* non obèses), naïves de tout traitement au TiO_2 et à microbiote « appauvri » par antibiothérapie ont conclu que seul le microbiote altéré de souris préalablement traitées aux nanoTiO_2 induisait des dommages tissulaires du côlon. Ces effets étaient accompagnés d'une infiltration de neutrophiles et d'une réponse inflammatoire locale (élévation d'IL-17 pro-inflammatoire et diminution d'IL-10 anti-inflammatoire). L'ensemble de ces observations était associé à une diminution du taux de butyrate chez les receveuses. Ces effets correspondant à ceux observés chez les souris obèses, les auteurs ont conclu qu'ils étaient essentiellement et directement induits par le microbiote préalablement altéré par le nanoTiO_2.

Conclusions sur le microbiote

Pour rappel, tel que mentionné dans le guide d'ERS nanospécifique de l'Anses (2021), les études sur le microbiote ne sont pas, à ce stade, retenues par le GT pour la conduite de l'ERS du nanoTiO_2. En effet, Il n'existe pas à l'heure actuelle de lignes directrices ou de protocoles représentatifs pour évaluer la complexité du microbiote tel que cela est mentionné dans le guide de EFSA de 2018. De plus, les difficultés d'interprétation des résultats ne permettent pas, pour le moment, d'exploiter efficacement ce type d'études au sein d'une ERS.

Dans l'étude de Cao *et al.* (2020), le GT relève plusieurs limitations méthodologiques. Les études de transfert de flore souffrent d'un biais qui impacte la conclusion selon laquelle le microbiote intestinal altéré serait directement responsable de la plupart de ces observations (inflammation, dommages tissulaires). En effet, les données de concentration de titane dans les selles témoignent d'une très forte teneur résiduelle en particules de TiO_2 au moment du transfert de flore. Autrement dit, on ne peut exclure que les effets observés chez les souris receveuses soient plutôt le résultat de ces particules réintroduites avec les selles dans ce groupe d'animaux.

3.4.4.3. Conclusions relatives à la toxicité générale

Les 2 études conduites selon les lignes directrices de l'OCDE pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours ne rapportent aucun effet et ont permis aux auteurs de définir une NOAEL de 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$. Le GT n'est pas en mesure de valider ce repère toxicologique car l'un des nanoTiO_2 utilisés (recouvert d'alumine et majoritairement rutile) n'est pas représentatif de la fraction nanométrique du E171. De plus, certains paramètres additionnels en lien avec l'immunité doivent être considérés pour l'établissement de ce repère (Anses 2021). Le GT note plusieurs effets potentiels issus d'études ne suivant pas de lignes directrices de l'OCDE au niveau hépatique, cardiovasculaire, intestinal et rénal. Des modulations de paramètres biochimiques, hématologiques et immunitaires sont également observées. Dans

l'optique de définir un point de repère toxicologique exploitable dans le cadre de l'évaluation du risque de la fraction nanométrique du E171, le GT recommande la mise en place d'une étude de toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours, selon la ligne directrice 408 de l'OCDE, menée à partir d'un mélange de nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171 afin de confirmer les effets observés (détails en section 3.4.5).

3.4.5. Cancérogénicité

- **<u>Etude de cancérogenèse du NTP</u>**

Des études de cancérogenèse réalisées avant 1979 (NTP 1979) ont été menées sur du TiO_2 Unitane® (forme anatase) chez des souris B6C3F1 (50 individus/sexe) exposées à des doses dans l'alimentation allant de 0 à 6 500 mg de TiO_2 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les mâles et de 0 à 8 350 mg de TiO_2 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les femelles pendant 103 semaines. Des observations histopathologiques ont été réalisées sur une trentaine d'organes. Les conclusions des auteurs indiquent que le TiO_2 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 dans l'alimentation allant de 0 à 2 250 mg de TiO_2 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les mâles et de 0 à 2 900 mg de TiO_2 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les femelles pendant 103 semaines. Des observations histopathologiques ont également été réalisées sur une trentaine d'organes. Les résultats indiquent que le TiO_2 administré par voie orale (dans les aliments) n'est pas cancérogène chez le rat à cette gamme de doses. En 2016, lors de la réévaluation du E171, le groupe d'experts de l'EFSA a fixé une dose sans effet nocif observable (NOAEL) à 2 250 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} à partir de cette étude de cancérogenèse. Le GT n'est pas en mesure de valider ce repère toxicologique car il a identifié plusieurs limitations en lien avec la méthodologie et l'interprétation des résultats comme indiquées ci-dessous :

- Cette étude a été menée à partir d'Unitane® (anatase, distribution en taille non spécifiée). Aucune caractérisation physico-chimique n'a été menée sur cette substance et aucune information ne permet de garantir les similitudes en termes de caractérisation physico-chimique entre l'Unitane® et le E171.
- Le schéma de traitement des animaux indique que seulement 2 doses ont été utilisées, cependant la ligne directrice de l'OCDE 451 indique que 3 doses sont nécessaires pour mener à bien des études de cancérogénicité.
- Les auteurs estiment que l'augmentation des tumeurs de la thyroïde chez le rat ne sont pas liés au traitement des animaux à l'Unitane®. Cependant, l'un des « reviewers » de l'article estime que les résultats sont équivoques et que les données à disposition ne permettent pas de conclure clairement. L'un des extraits de la publication est rapporté ci-dessous :

  "Although the staff did not find the thyroid tumors to be statistically significant, the primary reviewer emphasized that the evidence was insufficient to conclude that Titanium Dioxide was not carcinogenic. He recommended that the report be accepted with the conclusion modified to indicate the equivocal findings in female rats. He suggested that the compound be considered for retest based on its wide human exposure and unclear findings in treated female rats.

It was, concluded that, under the conditions of this bioassay, Titanium Dioxide was not carcinogenic by the oral route of exposure for B6C3F1 mice, but that no firm conclusion can be reached about the possible carcinogenicity of this compound to Fischer 344 rats, at this time.

There was no objection to the recommendation that the conclusion be modified as suggested. There also was no objection to the recommendation that Titanium Dioxide be considered for retest."

- **<u>Régulation génique</u>**

Les trois publications de Proquin *et al.* (2018 a, b, c) ont été analysées dans le cadre d'une précédente expertise de l'Anses (Anses 2019). Ces résultats sont 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)$^{-1}$ j^{-1}, 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 (témoin 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 pc)$^{-1}$ en injection intrapéritonéale une semaine avant l'expérience ainsi qu'une administration de 2% de DSS dans 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 (27 parmi lesquels 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 tels 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.

En 2019, l'Anses soulignait dans son avis que l'étude 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.

Conclusions relatives à la cancérogénicité

L'étude menée par le NTP en 1979 présente plusieurs limitations qui ne permettent pas au GT de valider ses résultats de cancérogène menée chez le rat et la souris. Notamment, le GT relève le manque de caractérisation physico-chimique du TiO_2 utilisé, l'absence d'une troisième dose et des conclusions équivoques quant à l'apparition de tumeurs au niveau de la thyroïde des rats femelles. Dans ce contexte, une nouvelle étude OCDE de cancérogénicité menée à partir d'un mélange de nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171 doit être mise en place (détails en section 3.5.4). Plusieurs critères identifiés par le GT dans le cadre de cette saisine justifient la mise en place d'une telle étude : (i) les résultats de toxicocinétique soulignent l'accumulation de particules de TiO_2 dans les organes systémiques et reproducteur (chez les femelles), (ii) l'observation de lésions pré-néoplasiques au niveau du colon de rats (voir section toxicologie générale), (iii) la dérégulation de gènes impliqués dans la cancérogenèse colorectale.

3.4.6. Neurotoxicité et neuro-développement

3.4.6.1. Etude de neurotoxicité

- **Etudes conduites selon les lignes directrices de l'OCDE**

  - E171

Aucune étude suivant les lignes directrices de l'OCDE portant sur l'impact neurotoxique potentiel du E171 n'a été identifiée par le GT.

  - NanoTiO_2 compris entre 10 et 100 nm

Dans l'étude de Sofranko *et al.* (2021), des souris ont été exposées à du P25 pendant 28 jours à une dose de 1% en masse dans l'aliment. Les auteurs se sont principalement intéressés aux effets relatifs à la neuro-inflammation, aux fonctions motrices, à l'apprentissage et à la mémoire selon la ligne directrice de l'OCDE 424. Aucun effet sur le poids des organes n'est rapporté (le GT note l'absence d'information relative au poids relatif du cerveau). Aucun effet sur l'intégrité des astrocytes n'est observé. L'absence de neuro-inflammation est suggérée par l'absence de modulation des niveaux d'expression de certains biomarqueurs (GFAP, Iba^{-1}) et

de cytokines (TNF-α, IL6 et IL1β) recherchés dans le cerveau. Les auteurs ne relèvent pas de modifications relatives aux protéines impliquées dans la cohésion et la structure des cellules endothéliales microvasculaires du cerveau (claudine, occludine, ZO-1) suggérant le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Aucun effet n'est observé sur la fonction motrice, l'apprentissage et la mémoire durant la période de traitement ni même après 14 jours de récupération des animaux. Les auteurs concluent à l'absence d'effet cérébral lié au traitement. Néanmoins, les auteurs n'excluent pas des effets possibles à plus long terme, notamment en cas d'accumulation dans le cerveau, après exposition à d'autres formes de nanoTiO_2 comme le E171, ou selon une autre modalité d'administration par voie orale (eau de boisson, gavage *vs* prise d'aliment solide) qui pourrait entraîner des différences majeures dans la cinétique d'exposition et donc de potentiels effets associés différents.

- <u>NanoTiO_2 < 10 nm</u>

Aucune étude de neurotoxicité menée avec du nanoTiO_2 < 10 n'a été identifiée par le GT.

- **<u>Etudes ne suivant pas les lignes directrices de l'OCDE</u>**

- <u>E171</u>

Le GT n'a identifié aucune étude portant sur l'impact neurotoxique potentiel du E171.

- <u>NanoTiO_2 compris entre 10 et 100 nm</u>

Dans l'étude de Zhang *et al.* (2020), des souris ont été exposées par gavage durant 30 jours à du nanoTiO_2 à une dose de 150 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs observent une expression plus forte du marqueur HuC/D dans le système nerveux entérique, ainsi qu'une diminution de l'expression des transcrits de récepteurs à la somatostatine mais pas de variation dans l'expression des neurones sérotoninergiques. Les auteurs rapportent également une inhibition de l'activité locomotrice (test « open field ») mais pas de trouble de la mémoire (« water maze »). Aucun effet sur le tissu cérébral n'est observé.

- <u>NanoTiO_2 < 10 nm</u>

Dans les études de Grissa *et al.* (2016 et 2020), des rats ont été gavés pendant 60 jours à des doses de 50, 100 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs ont observé une diminution du poids relatif du cerveau, une augmentation de la concentration en titane dans le cortex de manière dose-dépendante, la présence de souffrances neuronales et de foyers de cellules gliales dans le cortex frontal. Les auteurs ont également relevé une diminution globale de l'activité de l'acétylcholine estérase, une diminution de l'expression des enzymes antioxydantes, et une augmentation des marqueurs de l'inflammation (IL-6, oxyde nitrique).

3.4.6.2. Etudes de neurodéveloppement

- **<u>Etudes conduites selon les lignes directrices de l'OCDE</u>**

- E171

Des études sur le neurodéveloppement ont été menées avec du E171 au cours d'une étude EOGRTS (voir section sur la toxicité pour la reproduction et le développement). Suite à l'appel à données publié par la Commission européenne en 2017, les fabricants de TiO_2 ont transmis en 2020 les résultats d'une étude de toxicité pour la reproduction étendue sur une génération (EOGRTS) suivant les lignes directrices de l'OCDE 443. Plusieurs groupes de rats ont été traités avec du E171 (50% de nanoparticules en nombre) à des doses de 100, 300 et 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ dans les aliments. Le groupe de la génération F0 a été exposé 10 semaines avant l'accouplement jusqu'au sevrage de la descendance F1. Le groupe de la génération F1 a été exposé à partir du sevrage jusqu'au $4^{ème}$ ou $8^{ème}$ jour post naissance de la descendance F2. Enfin, le groupe de la génération F2 a été exposé par le lait maternel jusqu'au $4^{ème}$ ou $8^{ème}$ jour post naissance.

Concernant l'impact sur le neurodéveloppement, des variations, sans effets dose-réponse, sur la force de préhension et l'écartement des membres postérieurs ont été mis en évidence chez les femelles. Ces effets ne sont pas corrélés à d'autres changements (tonus musculaire, reflexe, démarche, etc.), ni soutenu par l'examen histopathologique du cerveau. Selon le panel de l'EFSA (2021), il est peu probable que les variations observées soient liées à l'exposition au E171. Cependant, le panel de l'EFSA souligne l'absence de données quantitatives relatives aux nerfs périphériques. De manière globale, le panel conclut à l'absence d'effet du E171 sur les paramètres neurofonctionnels chez la descendance.

- $NanoTiO_2$ compris entre 10 et 100 nm

Aucune étude sur le neurodéveloppement menée avec du $nanoTiO_2$ compris entre 10 et 100 nm n'a été identifiée par le GT.

- $NanoTiO_2 < 10$ nm

Aucune étude sur le neurodéveloppement menée avec du $nanoTiO_2 < 10$ nm n'a été identifiée par le GT.

- **Etude ne suivant pas les lignes directrices de l'OCDE**

- E171

Aucune étude ne porte sur l'impact neurotoxique potentiel du E171 au cours du développement n'a été identifiée par le GT.

- $NanoTiO_2$ compris entre 10 et 100 nm

Dans l'étude de Mortensen *et al.* (2022), des rats nouveau-nés ont été exposés à du P25 (21 nm) à une dose de 10 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ pendant 4 jours au cours de différents stades de croissance. Ainsi, 3 groupes de rats ont été exposés pendant les 3 fenêtres post natales J2 à J5, J7 à J10 ou J17 à J20. Une augmentation du poids relatif du cerveau a été observée chez

les mâles du groupe J 7-10 ainsi qu'une diminution de la fréquence cardiaque chez les femelles des groupes J 7-10 et J 17-20. Une réponse réduite est observée dans le test des réflexes chez les femelles du groupe J 2-5 ainsi qu'une modulation des performances locomotrices chez les femelles (groupes J 7-10) et les mâles (groupe J 17-20). Les auteurs ont également observé une modulation des niveaux de neurotransmetteurs catécholaminergiques (dopamine, noradrénaline) mais pas des récepteurs sérotoninergiques, dans le cerveau des mâles et des femelles dans les groupes J 7-10 et 17-20. La biosynthèse et le métabolisme des acides aminés et la biosynthèse de l'aminoacyl-ARNt sont dominants parmi les voies métaboliques perturbées. Cette étude suggère aussi que l'exposition orale des nouveau-nés à du nanoTiO_2 induit un stress oxydant systémique de faible intensité en même temps que des modifications des acides aminés non essentiels, ce qui pourrait expliquer les changements observés dans les performances neurocomportementales et les concentrations de neurotransmetteurs dans les tissus cérébraux.

Les études de Mohammadipour *et al.* (2013 et 2014) puis d'Ebrahimzadeh *et al.* (2017) se sont intéressées aux effets du nanoTiO_2 sur le neurodéveloppement chez le rat. Dans la première étude de 2013, des rats femelles ont été exposées par gavage à une dose de 100 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ entre les jours 2 et 21 de la lactation puis entre les jours 2 et 21 de la gestation dans la seconde étude de 2014. Selon les auteurs, l'exposition indirecte des nouveau-nés par le lait maternel de mères exposées au nanoTiO_2 conduit, à l'âge adulte, à des déficits d'apprentissage et de mémorisation. Contrairement à l'interprétation des auteurs, les données issues du test du « water maze » indiqueraient, selon le GT, une plus grande capacité d'apprentissage chez les exposés que chez les témoins. Concernant le test d'évitement passif il n'y aurait aucun effet mémorisé du choc après 1h, 1 jour et 2 jours. Au-delà de 2 jours après le choc, aucune différence significative entre les témoins et les exposés n'est observée. Selon les auteurs, l'exposition *in utero* des nouveau-nés par les mères exposées pendant la période de gestation conduit à la présence de titane dans l'hippocampe, une augmentation du poids relatif du cerveau, une diminution de la mémorisation (test d'évitement) chez les individus exposés et à l'absence d'effet sur la mémoire de reconnaissance spatiale (sur 4 tests successifs réalisés du « water maze », une différence significative apparait au fur et à mesure des tests mais uniquement au premier jour).

L'étude d'Ebrahimzadeh *et al.* (2017) complète ces travaux, à l'aide de 2 groupes de rats femelles exposés par gavage aux mêmes nanoTiO_2, l'un durant la période de gestation, l'autre durant la lactation à une dose de 100 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$. Selon les auteurs, l'exposition *in utero* des nouveau-nés par les mères exposées pendant la période de gestation a conduit à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans l'hippocampe des rats mâles âgés de 1 jour, à une diminution du nombre de neurones granulaires immatures dans les champs ammoniens (mais pas dans le gyrus denté) ainsi qu'une modulation de l'expression de gènes (Bax et Bcl2) impliqués dans le contrôle de l'apoptose. L'exposition indirecte des nouveau-nés par le lait maternel a conduit à l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans l'hippocampe des mâles de 22 jours, à une diminution du nombre de neurones granulaires immatures dans le gyrus denté ainsi qu'à une modulation de l'expression de gènes (Bax et Bcl2) impliqués dans le contrôle de l'apoptose au niveau de l'hippocampe.

- <u>NanoTiO_2 < 10 nm</u>

Zhou *et al.* (2019) se sont intéressés au neurodéveloppement de la descendance issue de souris femelles exposées à du nanoTiO_2 au cours de la phase de gestation et de lactation à des doses de 1,25 ; 2,5 et 5 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$. Les auteurs observent une augmentation de la concentration en titane dans l'hippocampe, des changements histologiques (apoptose, nécrose, œdèmes) au niveau de l'hippocampe, une diminution de la longueur des filaments dendritiques et une modulation de l'expression de marqueurs impliqués dans la structure cellulaire de l'hippocampe.

Conclusions relatives à la neurotoxicité et au neurodéveloppement

Il n'y a pas d'études portant sur l'impact neurotoxique du E171. Quelques études soulignent la présence de titane et de particules de TiO_2 dans le tissu cérébral des adultes (Kreling *et al.* 2017, Lee *et al.* 2019, Grissa *et al.* 2020) et de la descendance (Mohammadipour *et al.* 2013 et 2014, Zhou *et al.* 2019) indiquant le passage possible des nanoTiO_2 dans le compartiment cérébral après ingestion. Le GT regrette que ces mesures ne soient pas systématiquement précédées d'une exsanguination afin de s'assurer que le titane mesuré ne provienne pas du sang circulant.

Concernant les effets neurotoxiques, l'unique étude conduite selon les lignes directrices de l'OCDE (Sofranko *et al.* 2021) ne rapporte aucun effet cérébral lié à l'ingestion répétée de P25 sur 28 jours. Le GT estime que cette étude est correctement menée selon une approche multiparamétrique et une voie d'administration réaliste. Cependant, il note l'absence de dosage du titane dans les tissus ce qui ne permet pas de s'assurer de l'exposition du cerveau dans ces conditions de traitement. De plus, cette étude ne permet pas d'exclure des effets possibles à plus long terme, notamment en cas d'accumulation de TiO_2 dans le cerveau. Les études de neurotoxicité ne suivant pas les lignes directrices de l'OCDE révèlent différents effets potentiels : diminution du poids relatif du cerveau, neurones en apoptose, altération du système cholinergique (diminution de l'activité AchE), un processus inflammatoire (surexpression de cytokines et activation gliale) dans certaines régions cérébrales, une possible altération de l'expression des enzymes anti-oxydantes, une diminution de l'expression des récepteurs à la somatostatine dans le compartiment nerveux de l'intestin.

Les effets du E171 sur le neurodéveloppement ont été étudiés chez des rats au cours d'une étude EOGRTS. Cette étude ne rapporte aucun effet sur les paramètres neurofonctionnels chez la descendance. L'examen d'un effet de l'ingestion de nanoTiO_2 sur le neuro-développement est abordé de façon solide dans une étude ne suivant pas les lignes directrices de l'OCDE (Mortensen *et al.* 2022) qui montre que l'administration orale de nanoTiO_2 à des ratons nouveau-nés jusqu'au sevrage pourrait avoir un impact sur les performances neurocomportementales, avec une altération des concentrations de neurotransmetteurs catécholaminergiques. Le GT estime que cette étude est rigoureuse, bien décrite et présente une approche multiparamétrique avec 3 fenêtres d'exposition différentes chez les nouveau-nés représentant des stades de maturation nerveuse différents. Dans cette étude, les femelles seraient plus sensibles que les mâles. Les autres études disponibles indiquent d'autres effets potentiels chez la descendance telles que l'augmentation du poids relatif du cerveau, des atteintes histologiques de l'hippocampe, une possible altération de la mémoire et une possible augmentation de mort de neurones par apoptose.

Concernant les effets potentiels observés, ces derniers sont issus de publications pour lesquelles le GT a identifié des limitations méthodologiques telles que le nombre d'animaux traités non précisés (Mohammadipour *et al*. 2013, Grissa *et al*. 2016), l'absence d'examens histologiques (Mohammadipour *et al*. 2013), des tests effectués uniquement chez les mâles (Mohammadipour *et al*. 2014), des mesures de prolifération peu conventionnelles (Mohammadipour *et al*. 2014), un nombre de répétitions analytiques non précisé (Grissa *et al*. 2016, Zhang *et al*. 2020), des propositions mécanistiques peu convaincantes (Grissa *et al*. 2016), l'absence de scoring en histologie (Grissa *et al*. 2020, Zhou *et al*. 2019), l'absence de coloration histologique spécifique (Grissa 2 *et al*. 020), des manques de clarté sur le protocole expérimental (Zhang *et al*. 2020, Zhou *et al*. 2019), des interprétations erronées (Zhang *et al*. 2020), l'usage d'une dose unique (Zhang *et al*. 2020, Sofranko *et al*. 2021, Mortensen *et al*. 2022, Mohammadipour *et al*. 2013 et 2014, Ebrahimzadeh *et al*. 2017), une caractérisation des nanoTiO_2 imprécise (Ebrahimzadeh *et al*. 2017), des illustrations histologiques de faible qualité (fort bruit de fond, grandissement insuffisant) (Ebrahimzadeh *et al*. 2017) et l'absence d'information relative au passage et à l'accumulation de titane dans le tissu cérébral des mères et des nouveaux nés (Ebrahimzadeh *et al*. 2017, Mohammadipour *et al*. 2013 et 2014).

Dans ce contexte, le GT recommande la mise en place d'études de neurotoxicité et neurodéveloppement selon les lignes directrices de l'OCDE à partir d'un mélange de nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171 (détails en section 3.5.4).

3.4.7. Toxicité pour la reproduction et le développement

- **<u>Etudes conduites selon les lignes directrices de l'OCDE</u>**

  - <u>E171</u>

Suite à l'appel à données publié par la Commission européenne en 2017, les fabricants de TiO_2 ont transmis en 2020 les résultats d'une étude de toxicité pour la reproduction étendue sur une génération (EOGRTS) suivant les lignes directrices de l'OCDE 443 (EFSA 2021). Plusieurs groupes de rats ont été traités avec du E171 (50% de nanoparticules en nombre) à des doses de 100, 300 et 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ dans les aliments. Le groupe de la génération F0 a été exposé 10 semaines avant l'accouplement jusqu'au sevrage de la descendance F1. Le groupe de la génération F1 a été exposé à partir du sevrage jusqu' au 4ème ou 8ème jour post naissance de la descendance F2. Enfin le groupe de la génération F2 a été exposé par le lait maternel jusqu'au 4ème ou 8ème jour post naissance.

Le panel d'experts de l'EFSA (2021) a validé l'absence d'effet néfaste lié au traitement au E171 pour les groupe F0 et F1 concernant les observations cliniques, la consommation alimentaire, les paramètres hématologiques, biochimiques, endocriniens et les pathologies cliniques issues de l'observation macro et microscopique des animaux.

Concernant les données relatives à la toxicité pour la reproduction, le panel d'experts de l'EFSA a noté l'absence d'évaluation du sperme au niveau de l'épididyme telle que mentionnée dans les lignes directrices de l'OCDE. Le panel estime que cette donnée ne change pas la conclusion indiquant l'absence d'effet du E171 sur les fonctions sexuelles et la fertilité des mâles et des femelles des groupes F0 et F1.

Concernant la toxicité développementale, le panel souligne le fait que la puberté chez les mâles n'a pas été évaluée selon les recommandations des lignes directrices. Cependant, le panel estime que cette donnée n'est pas critique pour la conclusion indiquant l'absence d'effet du E171 sur le développement pré et postnatal des individus des groupes F1 et F2.

Concernant le neurodéveloppement, des variations, sans effets dose-réponse, sur la force de préhension et l'écartement des membres postérieurs ont été mis en évidence chez les femelles. Ces effets ne sont pas corrélés à d'autres changements (tonus musculaire, reflexe, démarche, etc.). Selon le panel, il est peu probable que les variations observées soient liées à l'exposition au E171.

Enfin, concernant l'immunotoxicité pour le développement, des rats de la génération F1 ont préalablement été immunisés avec un antigène (keyhole limpet haemocyanin (KLH)) afin de mesurer la réponse humorale (production d'anticorps IgM anti-KLH). Ce test est classiquement utilisé pour évaluer l'effet (immunosuppresseur ou immunostimulateur) d'un composé xénobiotique. Les auteurs de l'étude ont ainsi évalué la capacité du E171 à moduler cette production d'anticorps. Afin de valider les performances de ce test, un groupe témoin, préalablement immunisé avec le KLH a été traité avec un immunosuppresseur (cyclophosphamide (CY)) conduisant à 50% d'inhibition de la production d'IgM anti-KLH. Les auteurs ont observé une diminution (-9%) de la quantité d'IgM anti-KLH à la plus forte dose uniquement chez les mâles. Des limitations méthodologiques concernant le groupe témoin ne permettent cependant pas de confirmer la validité du test, notamment le fait que le groupe KLH contrôle exposé à l'agent immunosuppresseur CY n'ait pas été traité selon le même schéma temporel que les autres groupes d'animaux pour valider le test. Le panel de l'EFSA (2021) a validé par ailleurs la conclusion des auteurs selon laquelle les animaux testés ont présenté une faible réponse immunogène à l'antigène KLH qui ne permet pas de conclure quant aux effets du E171 sur le développement du système immunitaire. D'autres paramètres ont également été évalués par les auteurs notamment les sous-populations de lymphocytes au niveau de la rate où aucune différence significative n'a été relevée entre les groupes E171 et les animaux témoins, quel que le soit le sexe. Une augmentation du taux de lymphocytes B a été observée chez le groupe d'animaux préalablement immunisés avec le KLH. Cette modulation n'a pas été observée dans le groupe d'animaux exposés au KLH et au CY ainsi que dans le groupe n'ayant pas été préalablement immunisé par KLH. Selon les auteurs, ces modulations seraient liées à l'immunisation par KLH et non au traitement au E171. Le panel d'experts de l'EFSA est en désaccord avec ces conclusions car les groupes d'animaux traités n'ont pas le même âge au moment de la mesure ce qui ne permet pas de comparer les résultats entre eux. De plus, les analyses en cytométrie de flux des sous-populations de lymphocytes n'ont pas été réalisés lors d'une même série de mesure mais séparément, ce qui a pu engendrer des biais en termes de marquage et de quantification des cellules. Le panel d'experts de l'EFSA n'est pas en mesure de conclure quant à l'effet du E171 sur le développement du système immunitaire.

- <u>NanoTiO_2 compris entre 10 et 100 nm</u>

Dans l'étude de Lee *et al*. (2019), des rats femelles ont été exposées par gavage à du nanoTiO_2 au cours de leur gestation (du jour 6 à 19) à des doses de 100, 300 et 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Cette étude a été menée selon la ligne directrice de l'OCDE 414 et les bonnes pratiques de laboratoire. Les auteurs rapportent une augmentation de la teneur en titane dans le foie, le cerveau et le placenta des mères à la plus forte dose. Aucun effet ni aucune

modification n'ont été observés concernant les paramètres suivants : le poids des organes, les corps jaunes, l'examen macroscopique du placenta, l'implantation, la mortalité fœtale, le poids des fœtus, l'examen externe et interne des fœtus. Dans le cadre de cette étude, une NOAEL de 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} est proposée par les auteurs.

- <u>NanoTiO$_2$ < 10 nm</u>

Aucune étude de toxicité pour la reproduction et le développement menée avec du nanoTiO$_2$ < 10 nm n'a été identifiée par le GT.

- **<u>Etudes ne suivant pas les lignes directrices de l'OCDE</u>**

- <u>E171</u>

Aucune étude de toxicité pour la reproduction et le développement menée avec du E171 n'a été identifiée par le GT.

- <u>NanoTiO$_2$ compris entre 10 et 100 nm</u>

Les études relatives au neurodéveloppement sont rapportées dans la section neurotoxicité (Ebrahimzadeh *et al*. 2017 et Mohammadipour *et al*. 2013, 2014).

Dans l'étude de Tassinari *et al*. (2014), les auteurs se sont intéressés aux systèmes endocrinien et reproducteur de rats exposés durant 5 jours à des doses de 1 et 2 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Une augmentation du niveau de titane dans les ovaires et la rate ont été observés (pas de modification dans la thyroïde et l'utérus). Une apoptose des cellules de la granulosa et une nécrose des cellules du cortex au niveaux des ovaires ont été mises en évidence. Une légère atteinte histologique de la thyroïde est observée chez les mâles. Les auteurs indiquent également une augmentation des niveaux de testostérone et de T3 chez les mâles et une diminution de testostérone chez les femelles.

Yao *et al.* (2021) ont étudiés les effets du nanoTiO$_2$ sur des rates gestantes et leur descendance. Les rates ont été exposées à une dose de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} du premier au 20ème jour de lactation après la naissance des nouveau-nés. Chez les mères, une augmentation de la concentration en titane est mesurée dans les glandes mammaires et dans le colostrum. La présence de titane n'est plus détectée dans le lait au 19ème jour d'allaitement. Une diminution du taux de lactose est observée dans la composition du lait des mères exposées. Une atteinte histologique est observée au niveau des alvéoles des glandes mammaires sans modification du poids relatif de ces dernières. Chez la descendance, du titane est détecté dans l'estomac et l'intestin. Des modulations hématologiques (hématocrite, hémoglobine) et du poids relatif de certains organes (cœur, foie, poumons, rate et cerveau) sont rapportés. Enfin, une réduction de la taille des ratons sans altération de la prise de poids est également mentionnée.

Dans l'étude de Zhang *et al*. (2018), des souris ont été exposées par gavage, durant la période de gestation (13 premiers jours), à des doses de 1 et 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs évoquent une diminution du poids relatif et des atteintes structurales du placenta. Des diminutions de l'expression de gènes de la fonction placentaire (contrôle de la différenciation cellulaire du trophoblaste et de son homéostasie, développement du labyrinthe), de la vascularisation fœtale dans le placenta, du nombre de cellules NK (*natural killer*) et de la prolifération cellulaire

au niveau du placenta ont été rapportées. Les auteurs notent également une activation dose-dépendante de l'apoptose. D'après les auteurs, l'ensemble de ces altérations n'entraîne pas de dégradation de la fonction placentaire ni une diminution de la viabilité des fœtus.

- <u>NanoTiO_2 < 10 nm</u>

Hong *et al.* (2017) se sont intéressés aux effets du nanoTiO_2 chez des souris gavées durant leur période de gestation (17 premier jours) à des doses de 25, 50 et 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Concernant les mères, les auteurs rapportent une diminution du poids corporel, une augmentation de la teneur en titane (plasma et placenta), une diminution des teneurs en calcium et en zinc ainsi qu'une diminution du poids des placentas. Chez les fœtus, les auteurs rapportent une augmentation de la teneur en titane, une diminution des teneurs en calcium et en zinc, une diminution du poids corporel et de la taille, des atteintes au niveau du squelette (ossification, cartilage) et de leur morphologie (longueur et largeur). Le taux de mortalité fœtale a été augmenté de 60% dès la dose de 50 mg de TiO_2 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}, cet effet est corrélé au nombre élevé de sites de résorption placentaire par rapport aux témoins.

Dans l'étude de Hong *et al*. (2018), des souris ont été gavées durant 30 jours à des doses de 2,5 ; 5 et 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} afin d'évaluer leurs taux d'hormones et leur fertilité en fin de traitement. Les auteurs observent une diminution du poids corporel et des ovaires, une augmentation des follicules atrétiques ainsi qu'une infiltration neutrophilaire (marqueur d'inflammation). Ils rapportent également une élévation des taux de FSH, LH, AMH, PRL, TSH, T3 et T4 et une diminution du taux d'inhibine B, progestérone et œstradiol dans le sang. Le rapport FSH/LH augmente significativement de façon dose-dépendante, résultat corrélé négativement au taux de fertilité chez ces souris (chute de 15 à 40% des gestations). En parallèle, les auteurs rapportent une augmentation importante des marqueurs d'auto-immunité, en particulier une forte élévation d'anticorps TPO.

Conclusions relatives à la toxicité pour la reproduction et le développement

Les 2 études conduites selon les lignes directrices de l'OCDE menées avec du E171 et un nanoTiO_2 (21 nm) indiquent l'absence d'effet sur les fonctions de reproduction et le développement de la descendance. Cependant, le GT souligne que les lignes directrices ne sont pas respectées dans l'étude EOGRTS (décrite dans EFSA 2021) concernant l'évaluation de la fertilité et de la puberté chez le mâle et que le panel de l'EFSA n'a pas été en mesure de conclure sur le développement du système immunitaire. De plus, dans l'étude de Lee *et al*. (2019), le GT note : l'absence de paramètres demandés dans les lignes directrices (histologie de la thyroïde, distance anogénitale, cryptorchidie), que l'étude est menée avec seulement 12 femelles (au lieu de 20 demandées) et que la caractérisation du nanoTiO_2 est incomplète.

Dans les études qui ne suivent pas les lignes directrices de l'OCDE, le GT note différents effets potentiels en lien avec les fonctions de reproduction : atteintes cellulaires et histologiques au niveau des ovaires, du placenta et des glandes mammaires, une modulation des niveaux hormonaux ainsi qu'un passage du titane chez les nourrissons au cours de la gestation et de l'allaitement. Chez la descendance, des effets potentiels concernant des modifications hématologiques, morphologiques et des variations du poids des organes sont également rapportées. Pour ces études, le GT a identifié plusieurs limitations telles que : l'absence de quantification des atteintes histologiques (Hong *et al*. 2017), le cycle œstral non précisé (Hong *et al*. 2018, Tassinari *et al*. 2014), des temps d'exposition trop courts (Tassinari *et al*. 2014) ou

encore des résultats difficilement interprétables du fait de variations multiparamétriques (Yao *et al*. 2021).

Dans ce contexte, le GT recommande la mise en place d'une étude de toxicité pour la reproduction et le développement selon la ligne directrice 443 de l'OCDE à partir d'un mélange de nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171 (détails en section 3.5.4).

3.4.8. Incertitudes relatives aux données toxicologiques

Le GT a identifié plusieurs limitations relatives à la mise à jour des données toxicologiques :

- Les données toxicologiques collectées par le GT sont issues d'une recherche bibliographique menée sur un seul moteur de recherche (PubMed). Certaines publications non référencées dans cette base de données n'ont donc pas été considérées.
- Les données toxicocinétiques obtenues à partir d'une administration en intraveineuse n'ont pas été considérées dans le cadre de cette saisine. Le GT estime que cette voie d'administration ne reflète pas le devenir *in vivo* des nanoparticules administrées par voie orale.
- Les effets observés à partir d'un nanoTiO_2 (exemple P25 dont la taille moyenne est de 21 nm) ne peuvent pas être extrapolés à l'ensemble de la fraction nanométrique du E171 dont la gamme de taille est comprise entre 10 et 100 nm.
- L'absence quasi systématique de données physico-chimiques intrinsèques aux nanoparticules telles que la cristallinité et la chimie de surface ne permettent pas au GT d'évaluer l'influence de ces paramètres sur les effets toxicologiques.

3.5. Conclusions générales du GT « nano et alimentation » et du CES ERCA

3.5.1. Conclusions relatives aux calculs d'exposition

Le GT a déterminé les niveaux d'exposition des consommateurs français au E171 ainsi qu'à sa fraction nanométrique pour 5 classes d'âges différentes : les enfants de 1 à 2 ans, les enfants de 3 à 9 ans, les adolescents de 10 à 17 ans, les adultes de 18 à 65 ans et les personnes âgées de plus de 65 ans. Le GT a dans un premier temps déterminé les niveaux d'exposition des consommateurs à l'additif alimentaire E171 en se basant sur les niveaux de concentration de cet additif dans les catégories alimentaires ainsi que sur les niveaux de consommation issus de l'étude INCA3. Dans un second temps, le GT a déterminé les niveaux d'exposition des consommateurs à la fraction nanométrique du E171 à partir du pourcentage massique des nanoparticules constitutives du E171. Des scénarii d'exposition moyen et maximaliste pour les expositions au E171 sont proposés par le GT et différents calculs du % massique de la fraction nanométrique ont été considérés.

Dans le scénario représentatif d'une exposition du pire cas, les niveaux d'exposition moyens à la fraction nanométrique du E171 varient de 4,8 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ pour les personnes âgées à

29,1 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants (1-2 ans). Au 95ème centile, les niveaux d'exposition varient de 13,1 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les personnes âgées à 92,4 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pour les enfants (1-2 ans).

Le GT a également déterminé les contributeurs majoritaires à l'exposition : les produits de boulangerie fine, les boissons aromatisées avec sucre et les desserts font systématiquement partie des 5 premiers contributeurs quelle que soit la classe d'âge. Du fait du manque de données relatives aux niveaux de concentration en E171 dans les aliments infantiles, le GT n'a pas été en mesure de proposer des niveaux d'exposition pour les enfants de 0 à 1 an. Le GT tient à souligner que les données relatives aux concentrations en E171 pour un grand nombre de catégories alimentaires sont peu nombreuses, ce qui entraîne des incertitudes quant aux calculs des expositions pour l'ensemble des classes d'âges considérées.

3.5.2. Conclusions relatives aux données toxicologiques

Les principaux résultats issus des études toxicologiques relatives aux nanoTiO_2 sont résumés dans le tableau 15. Le GT précise qu'il n'a pas été en mesure, à partir des données collectées, de mettre en évidence un effet de la taille, de la cristallinité ou de la chimie de surface des particules de TiO_2 sur les potentiels effets toxicologiques.

Tableau 15 Conclusions relatives aux données toxicologiques

Type de données toxicologiques	Observations du GT	Commentaires du GT	Recommandations du GT
Toxicocinétique	La présence de titane (sous sa forme élémentaire) et de particules de nano TiO_2 a été démontrée dans différents organes systémiques (intestin, estomac, foie, sang, rate, rein, poumon, cerveau) et de la reproduction (ovaire, glande mammaire, placenta). La présence de nanoTiO_2 dans le placenta est source d'exposition de la descendance au cours de la gestation et le passage de nanoTiO_2 dans le lait maternel est source d'exposition de la descendance au cours de l'allaitement.	Selon le guide de l'Anses relatif à l'ERS nanospécifique (Anses 2021), les résultats de toxicocinétique indiquent que les études de cancérogenèse, de neurotoxicité et de toxicité pour la reproduction et le développement doivent être incluses dans la caractérisation du risque de la fraction nanométrique du E171	Le GT estime que les données de toxicocinétique collectées concernant l'absorption et la distribution du nanoTiO_2 sont suffisantes. Cependant, les études relatives à l'élimination et la redistribution sont peu étayées. Le GT recommande la mise en place d'études de toxicocinétique à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm afin de compléter les connaissances relative à l'élimination et la redistribution du nanoTiO_2.
Génotoxicité	Des résultats contradictoires relatifs aux tests des comètes (*in vitro* et *in vivo*) et des micronoyaux (*in vivo et in vitro*) ont été mis en évidence. Une seule étude *in vivo*, identifiée comme pertinente et pour laquelle le GT n'a pas identifié de limitations méthodologiques souligne la	Les tests de génotoxicité *in vitro* sont majoritaires et les tests *in vivo* peu nombreux. Le GT a identifié, pour la quasi-totalité des études, le non-respect des lignes directrices ainsi que différentes limitations	Du fait de la présence de résultats contradictoires (comètes et micronoyau) et d'un test positif du micronoyau *in vivo* validé par le GT, ce dernier recommande en première intention la mise en place d'études de génotoxicité *in vivo* du micronoyau et des

Type de données toxicologiques	Observations du GT	Commentaires du GT	Recommandations du GT
	capacité du nanoTiO_2 à générer des micronoyaux au niveau de la moelle osseuse.	relatives à la méthodologie et l'interprétation des résultats. Bien que le GT ait identifié une étude *in vivo* pertinente du micronoyau présentant un résultat positif ainsi que des résultats contradictoires issus de tests des comètes (*in vitro* et *in vivo*) et du micronoyau (*in vitro* et *in vivo*), le GT n'est pas en mesure de conclure sur la génotoxicité du nanoTiO_2 du fait des incertitudes identifiées.	comètes à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm. Des recommandations d'études *in vitro* de mutation génique et du micronoyau sont également proposées.
Toxicité générale	Les 2 études conduites selon les lignes directrices de l'OCDE pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours menées avec 2 nanoTiO_2 différents ne rapportent aucun effet et proposent une NOAEL de 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$. D'autres études ne suivant pas les lignes directrices de l'OCDE révèlent des effets potentiels au niveau hépatique, cardiovasculaire et intestinal. Des modulations de paramètres biochimiques, hématologiques et immunitaires sont également observées.	L'une des études conduites selon les lignes directrices de l'OCDE repose sur l'utilisation d'un nanoTiO_2 (rutile, enrobé d'alumine) non représentatif de la fraction nanométrique du E171. Certains paramètres complémentaires en lien avec l'immunotoxicité doivent être considérés pour la détermination d'un point de repère toxicologique issu d'une étude subchronique (voir Anses 2021). Ainsi, le GT n'est pas en mesure de retenir la NOAEL de 1000 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$.	Le GT recommande la mise en place d'une étude selon la ligne directrice 408 de l'OCDE pour la toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm afin de déterminer un point de repère toxicologique. Dans le cas où des variations du taux de lymphocytes Treg seraient observés, un test complémentaire de tolérance orale vis-à-vis d'antigènes alimentaires sera réalisé. Dans le cas où des modulations de paramètres du système immunitaire seraient observées, une étude complémentaire sur la réponse humorale à un antigène sera mise en place.
Cancérogénicité	L'étude de cancérogenèse du NTP de 1979 conclut à l'absence de cancérogénicité du E171 chez la souris. Cependant, des conclusions équivoques sur l'apparition de tumeurs au niveau des thyroïdes chez les rats femelles sont rapportés. A partir de cette étude, l'EFSA propose en 2016 une NOAEL de 2250 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ chez les rats mâles. L'apparition de biomarqueurs précancéreux (ACF) au	Les conclusions équivoques relatifs à l'apparition de tumeurs au niveau de la thyroïde de rats femelles ainsi que des limitations méthodologiques (TiO_2 non caractérisé, seulement 2 doses testées) relevées dans l'étude de 1979 ne permettent pas au GT de valider la NOAEL de 2250 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ ni	Du fait des résultats de toxicocinétique, des limitations méthodologiques et des résultats équivoques de l'étude du NTP, le GT recommande la mise en place d'une étude OCDE de cancérogenèse chez le rat à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm afin de déterminer un point de repère toxicologique.

Type de données toxicologiques	Observations du GT	Commentaires du GT	Recommandations du GT
	niveau du colon et la dérégulation de gènes impliqués dans la cancérogenèse colorectale sont également observées dans certaines études menées avec du E171.	l'absence de cancérogenèse liée au E171.	
Neurotoxicité et neurodéveloppement	La seule étude conduite selon les lignes directrices de l'OCDE pour la neurotoxicité sur 28 jours menée avec un nanoTiO_2 de 21 nm ne rapporte aucun effet. Les autres études ne suivant pas les lignes directrices de l'OCDE rapportent des modifications structurales et de fonctionnement au niveau du tissu cérébral. Les études sur le neuro-développement suggèrent des modifications structurales (hippocampe) et neurocomportementale (motricité, mémoire) chez la descendance.	L'étude conduite selon les lignes directrices de l'OCDE est bien menée mais ne permet pas d'identifier des effets potentiels à long terme (90 jours et plus), notamment dans le cas d'une accumulation progressive du nanoTiO_2 dans le tissu cérébral. Les effets de neurotoxicité rapportées chez les adultes et sur le neurodéveloppement chez la descendance doivent être confirmés par des études conduite selon les lignes directrices de l'OCDE.	Du fait des résultats de toxicocinétique et des effets potentiels identifiés par le GT, ce dernier recommande la mise en place d'une étude selon la ligne directrice 424 de l'OCDE sur une période à minima de 90 jours avec preuve d'exposition (dosage au niveau du compartiment cérébral) à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm. Concernant le neurodéveloppement, une étude EOGRTS doit être conduite à partir du même mélange. Ces études doivent conduire à l'établissement de points de repère toxicologique.
Toxicité pour la reproduction et le développement	Les 2 études conduite selon les lignes directrices de l'OCDE menées avec du E171 (étude EOGRTS) et un nanoTiO_2 (21 nm) indiquent l'absence d'effet sur les fonctions de reproduction et le développement de la descendance. Une NOAEL de 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} est proposée dans l'étude menée avec le nanoTiO_2 de 21 nm. D'autres études ne suivant pas les lignes directrices de l'OCDE révèlent des effets potentiels sur les fonctions de reproduction (atteintes cellulaire et histologique des organes) et la morphologie des nouveaux nés.	Le GT souligne que les lignes directrices ne sont pas respectées pour ces études ce qui ne lui permet pas de valider l'absence d'effet du nanoTiO_2 sur les fonctions de reproduction et le développement ni de valider la NOAEL de 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}.	Du fait des résultats de toxicocinétique (présence de titane et/ou de particules de TiO_2 dans les organes de la reproduction et chez la descendance) et des effets potentiels observés, le GT recommande la mise en place d'une étude EOGRTS afin d'évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement (dont le neurodéveloppement voir ci-dessus). Cette étude sera menée à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm afin de déterminer un point de repère toxicologique.

3.5.3. Conclusions relatives à la caractérisation du risque

Afin de conduire la caractérisation du risque de la fraction nanométrique de l'additif alimentaire E171, le GT a déterminé les niveaux d'exposition des consommateurs français à la fraction nanométrique du E171. Dans l'optique de comparer ces niveaux d'exposition avec un point de repère toxicologique, le GT a collecté puis sélectionné des études toxicologiques *in vivo* et *in*

vitro. Leur pertinence a été évaluée en prenant en compte les requis toxicologiques nécessaires à la bonne conduite de l'ERS nanospécifique tels que définis dans le guide méthodologique de l'Anses (Anses 2021).

Après analyse des publications, le GT a identifié, pour la majorité des études, plusieurs incertitudes en lien avec la méthodologie et l'interprétation des résultats ainsi que des données manquantes qui ne lui permettent pas de finaliser la caractérisation du risque de la fraction nanométrique du E171. Différents points de repère toxicologique ont été proposés dans la littérature mais aucun n'a été validé par le GT du fait des propriétés physico-chimiques de certains nanoTiO_2 utilisés, du non-respect des lignes directrices de l'OCDE, de la mise en place de protocoles expérimentaux inadaptés et de la présence de résultats équivoques.

Pour finaliser cette caractérisation du risque, des études reposant sur les lignes directrices de l'OCDE et adaptées à la particularité de la nano-échelle (voir recommandation ci-dessous et Anses 2021) devront être menées afin de déterminer un point de repère toxicologique indispensable à la caractérisation du risque de la fraction nanométrique du E171.

3.5.4. Recommandations

Le GT émet des recommandations pour la réalisation d'études toxicologiques permettant de finaliser la caractérisation du risque de la fraction nanométrique du E171. Le GT estime que le E171 ne peut pas être utilisé dans ces études. En effet, si des effets sont observés après administration de E171, le GT ne serait pas en mesure de les imputer à la fraction nanométrique seule. Dans cette optique et en l'absence d'un nanoTiO_2 représentatif de la fraction nanométrique du E171, le GT préconise, pour l'ensemble des recommandations relatives aux études toxicologiques, d'utiliser un mélange de particules de TiO_2 dont la gamme de taille est comprise entre 10 et 100 nm et dont la cristallinité est de forme anatase (la trace de rutile est tolérée). Le GT rappelle que l'analyse granulométrique de la fraction nanométrique du E171, effectuée sur 16 échantillons différents, révèle que la plus petite taille des particules mesurée (en microscopie électronique) est de 10 nm. Le GT n'est pas en mesure de fournir des proportions pour les populations de particules constitutives du mélange. Néanmoins, les granulométries issues de l'analyse de différents lots de E171 indiquent que le nombre de particules augmentent avec la taille (jusqu'à 100 nm dans le cas de la fraction nanométrique). De même, le GT n'est pas en mesure d'indiquer la chimie de surface représentative de la fraction nanométrique du E171, certaines analyses évoquent la présence de phosphate ou de silicate à la surface des particules. Le GT souligne l'importance de systématiquement préciser la nature des molécules potentiellement présentes à la surface des particules de TiO_2.

Le GT alerte également sur les interférences potentielles liées à l'utilisation de particules nanométriques pouvant entraîner des biais quant à l'interprétation des résultats des tests *in vitro* (voir recommandations pour les études génotoxiques).

- **<u>Toxicocinétique</u>**

Afin d'étayer les connaissances relatives aux phénomènes d'élimination et ou de redistribution, le GT recommande la mise en place d'une étude de toxicocinétique complémentaire. Les

résultats issus de cette étude ne sont pas requis pour finaliser la caractérisation du risque de la fraction nanométrique du E171. Le GT propose aux équipes de recherche voulant poursuivre les études de toxicocinétiques la démarche suivante : l'administration du mélange de particules de nanoTiO_2, dont la gamme de taille est comprise entre 10 et 100 nm, s'effectuera par voie orale sur 14 jours et les durées d'observation s'étaleront *a minima* sur 90 jours. La détection/quantification des nanoTiO_2 dans les tissus seront menées par ICP (MS ou AES). Des observations complémentaires, telles que la microscopie électronique couplée à l'EDX, permettraient d'une part de valider l'état particulaire du TiO_2 et d'autre part de déterminer leur état d'agglomération/agrégation tout en localisant les sites d'accumulation au sein des cellules.

- **Génotoxicité**

Au vu des résultats *in vitro* et *in vivo* compilées par le GT, ce dernier recommande en première intention de mettre en place les tests de génotoxicité *in vivo* ci-dessous afin de statuer sur le potentiel génotoxique du nanoTiO_2 :

- Test du micronoyau *in vivo* sur cellules de moelle osseuse (selon la ligne directrice OCDE 474), sur cellules de colon (selon Vanhauwaert *et al.* 2001) et sur le foie (selon Hamada *et al.* 2019) ;
- Test des comètes *in vivo* (standard et modifié [avec enzyme de type Fpg ou hOGG1]) pour la détection des lésions oxydantes sur organes primo exposés (estomac glandulaire, intestin, colon) et systémiques (foie, rein, rate) selon la ligne directrice de l'OCDE 489. Dans le cas de résultats négatifs pour l'ensemble de ces organes, un test des comètes *in vivo* sera mené sur des cellules germinales mâles et femelles.

Pour l'ensemble de ces tests, les doses employées devront être justifiées, des preuves d'exposition devront être apportées (dosage de titane dans les organes en cas de résultats négatifs), la durée d'exposition sera *a minima* de 14 jours afin de s'assurer que les nanoparticules puissent atteindre les organes cibles et le prélèvement des tissus s'effectuera entre 2h et 6h après la dernière administration. Ces études seront menées à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm.

Bien que les tests de génotoxicité *in vitro* ne soient pas suffisants (au vu des résultats *in vitro* et *in vivo* compilés par le GT) pour statuer sur le potentiel génotoxique du nanoTiO_2, le GT propose les tests *in vitro* suivants pour les équipes de recherche voulant poursuivre les études relatives à la génotoxicité du nanoTiO_2.

- Test du micronoyau *in vitro* mené selon la ligne directrice de l'OCDE 487 sur des lymphocytes du sang périphérique humain ou issus d'autres mammifères ;
- Test de mutation génique sur cellules de mammifères selon les lignes directrices de l'OCDE 490[24].

[24] L'utilisation du test OCDE 490 au locus TK est privilégié par rapport au test OCDE 476 car il présente l'avantage de détecter les mutagènes, les clastogènes et les aneugènes.

Les lignes directrices de l'OCDE offrent un guide méthodologique sur des systèmes cellulaires bien définis ainsi que des critères de validation des résultats. Cependant, le GT estime que ces lignes directrices doivent être adaptées à la spécificité des nanomatériaux. Le comportement et la stabilité des nanoformes vont différer de leurs homologues moléculaires ou ioniques pouvant ainsi modifier les niveaux d'exposition réelles des cellules ainsi que les phénomènes d'internalisation intracellulaire. De plus, les propriétés de dissolution des nanomatériaux et les phénomènes de sédimentation peuvent également influencer la mise en place du protocole expérimental et l'interprétation des résultats. Dans ce contexte, le GT recommande aux opérateurs de considérer les points de vigilance listés ci-dessous dans une optique de standardisation des tests *in vitro* dans le cadre d'une évaluation du risque nanospécifique :

- Disposer de données de cytotoxicité afin : (i) de définir les doses du schéma de traitement, (ii) de disposer des données relatives à la nécrose et l'apoptose, en particulier pour le test des comètes, afin de s'assurer que les effets observés sont bien liés à des mécanismes génotoxiques ;
- Vérifier l'absence d'interférences (observation en microscopie, agglomérat, etc.) avec les tests *in vitro* utilisés (micronoyaux, comètes, cytotoxicité). Dans le cas du test du micronoyau, l'internalisation cellulaire des nanomatériaux pourrait être entravée lors de l'emploi de la cytochalasine B, utilisée pour bloquer la cytokinèse. Ainsi, il convient d'exposer les cellules aux nanomatériaux avant (au moins plusieurs heures) l'ajout de la cytochalasine B, comme décrit par Gonzalez *et al.* (2011). De même, la possible accumulation de nanomatériaux dans le cytoplasme pourrait générer des interférences lors de l'analyse des lames au microscope avec le risque que des micronoyaux puissent être occultés par les particules. L'utilisation de la cytométrie en flux pourrait permettre de contrecarrer cette limite ;
- En cas de résultat négatif, fournir une preuve de l'internalisation intracellulaire des nanoparticules à l'aide de méthodes adaptées. Les interactions des nanoparticules avec les cellules et les phénomènes d'internalisation intracellulaires peuvent varier en fonction des spécificités cellulaires et des propriétés physico-chimiques des nanoparticules (influence de la taille, de la morphologie, de la charge et de la chimie de surface) ;
- Du fait des variabilités évoquées au point précédent, des temps d'incubation courts (3 à 6h) et longs (24h) seront considérés ;
- Inclure des contrôles positifs et négatifs qui, si nécessaire, doivent considérer les spécificités des milieux dispersants (présence de sérum, etc.) ;
- Disposer des conditions de culture cellulaire (volume de traitement, taille des puits de culture, etc.) afin que les niveaux de concentrations (exprimés en masse ou surface) soient exploitables dans un contexte d'évaluation du risque ;
- Disposer de données historiques pour les témoins positifs et négatifs afin de pouvoir qualifier la significativité statistique des résultats obtenus.

- **Toxicité générale**

Le GT recommande la mise en place d'une étude de toxicité orale à doses répétées pendant de 90 jours selon la ligne directrice de l'OCDE 408. Au vu des effets potentiels relevés dans la littérature, le GT préconise de porter une attention particulière sur la barrière intestinale, le foie, le rein, le système cardiovasculaire ainsi que les paramètres immunologiques, biochimiques et hématologiques. Cette étude sera menée à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm dans l'optique de fixer un point de repère toxicologique.

Dans le cas particulier où des modulations sur la fréquence des lymphocytes Treg (impliqués notamment dans la tolérance aux aliments) seraient observées au cours de l'étude subchronique de 90 jours, un protocole d'induction de la tolérance orale vis-à-vis des antigènes (protéines) alimentaires sera mis en place. La mise en œuvre de ce test complémentaire chez les rongeurs nécessite une nouvelle étude de 90 jours, et la mise en place de la tolérance orale sera évaluée à l'aide d'un antigène modèle comme l'ovalbumine (OVA). Ce test correspond à l'induction d'une tolérance immunologique périphérique vis-à-vis de l'OVA administrée par voie orale, grâce à la mise en jeu du système immunitaire intestinal, en particulier les lymphocytes Treg responsables de mécanismes immunosuppresseurs. En l'absence de ligne directrice pour ce test, le protocole expérimental pourra reposer sur les études de Toda *et al.* (2016). Cette étude sera menée à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm.

Dans le cas d'un effet significatif sur un ou plusieurs compartiments cellulaires du système immunitaire au cours de l'étude subchronique de 90 jours (prolifération des cellules de la rate, avec analyse phénotypique des cellules T, B, NK), la capacité d'un individu à développer une réponse immunitaire humorale (c'est-à-dire une réponse anticorps) à un antigène particulier pourront être obtenues en suivant les tests complémentaires d'immunotoxicité développementale (cohorte 3) décrits dans l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération de l'OCDE (EOGRTS TG n°443). Cette étude sera menée à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm.

- **Cancérogenèse**

Du fait des résultats de toxicocinétique (présence de titane et/ou de particules dans les organes systémiques après administration orale), de l'apparition de biomarqueurs précancéreux (ACF) au niveau du colon chez le rat, de la dérégulation de gènes impliqués dans la cancérogenèse colorectale et des résultats équivoques concernant l'apparition de tumeurs de la thyroïde chez les rats femelles, le GT recommande la mise en place d'une étude de cancérogenèse chez le rat selon la ligne directrice de l'OCDE 451. Cette étude sera menée à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm.

- **Neurotoxicité**

Au vu des modifications structurales et de fonctionnement observées au niveau du tissu cérébral, le GT recommande la mise en place d'une étude de neurotoxicité selon les lignes directrices de l'OCDE 424 pour une durée d'exposition *a minima* de 90 jours à partir d'un

mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm. Cette étude intègrera un dosage du titane dans le cerveau après exsanguination et proposera une approche multiparamétrique en considérant des données d'histopathologie, des dosages de biomarqueurs (ROS, inflammation, neurotransmetteurs, marqueurs des synapses) et des observations comportementales (mémoire, équilibre, motricité).

- **Toxicité pour la reproduction et le développement**

Du fait des résultats de toxicocinétique (présence de titane et/ou de nanoparticules de TiO_2 dans les organes reproducteurs) et des effets potentiels relatifs à la fonction de reproduction, la morphologie des nouveau-nés et leur comportement, le GT recommande la mise en place d'une étude de toxicité pour la reproduction sur une génération (EOGRTS étendue jusqu' à la deuxième génération F2) selon la ligne directrice de l'OCDE 443 avec exploration spécifique de cohortes d'animaux pour effectuer des essais de toxicité pour la reproduction et le développement (cohorte 1), des essais de neurotoxicité pour le développement (cohorte 2), des essais d'immunotoxicité développementale (cohorte 3, en fonction des résultats observés lors de l'étude subchronique de 90 jours (voir recommandations précédentes). Cette étude sera menée à partir d'un mélange de particules couvrant la gamme de taille 10-100 nm.

- **Exposition des consommateurs**

Le GT a identifié un manque de données relatives à la concentration de l'additif alimentaire E171 dans différentes catégories alimentaires, notamment dans les aliments infantiles. Néanmoins, au vu de l'interdiction de l'additif alimentaire E171 (mise en application en août 2022), le GT n'est pas en mesure de proposer des recommandations d'études analytiques visant à quantifier le E171 dans les catégories alimentaires.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

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

Le présent avis s'intègre dans la continuité des travaux de l'Agence relatifs à l'évaluation du risque des nanomatériaux utilisés dans les aliments. La première phase de l'expertise (avis de l'Anses 2020) investiguait les débats et controverses en lien avec l'usage des nanomatériaux, l'identification des nanomatériaux manufacturés utilisés en tant qu'additifs alimentaires ainsi que l'identification des catégories alimentaires pouvant contenir ces nanomatériaux.

La deuxième phase de l'expertise (avis de l'Anses 2021) a conduit à l'élaboration d'une méthodologie d'évaluation du risque spécifique aux nanomatériaux manufacturés utilisés en tant qu'additifs alimentaires. Les premières étapes de cette méthodologie, reposant sur l'identification des nanomatériaux manufacturés et leur propriété de dissolution, permettent d'orienter l'évaluation du risque vers une approche « standard » ou « nanospécifique ». Dans le cas de l'approche nanospécifique, les étapes suivantes relatives aux calculs d'exposition et à la caractérisation du danger considèrent les propriétés de la nanoéchelle. Des critères ont

été de plus intégrés à cette méthode dans l'optique d'évaluer plus spécifiquement le risque sanitaire relatif à la fraction nanométrique des nanomatériaux manufacturés

Ce troisième volet de l'expertise, concluant les réponses à la saisine, a pour objectif de mener une application complète de cette méthodologie. Compte tenu des travaux menés antérieurement par l'Agence, les experts ont retenu l'additif alimentaire E171 comme candidat à cette évaluation du risque nanospécifique car ce nanomatériau est le plus étudié dans la littérature scientifique. De plus, la grande majorité des données toxicologiques disponibles dans la littérature sont issues d'études conduites avec du nanoTiO_2 (taille de particules comprise entre 1 et 100 nm) dont les dimensions sont uniquement représentatives de la fraction nanométrique du E171.

Par ailleurs, et en parallèle du travail méthodologique engagé par l'Anses, des décisions réglementaires successives relatives à l'usage du TiO_2 comme additif alimentaire sont intervenues. Il a été suspendu en France par une clause de sauvegarde à compter du 1er janvier 2020, clause qui a été prorogée en janvier 2021 dans l'attente de la réévaluation de la sécurité d'emploi de cet additif par l'EFSA. L'avis de l'EFSA, concluant à l'impossibilité d'exclure la génotoxicité du E171 (EFSA, 2021), a conduit l'Europe à prendre une décision d'interdiction de son utilisation en tant qu'additif alimentaire depuis le 07 aout 2022. L'Agence souligne à ce titre que les évaluations d'exposition dont elle rend compte dans le présent avis reflètent, non pas des expositions associées aux consommations alimentaires actuelles, mais celles qui prévalaient dans la période précédant les décisions d'interdiction. L'agence précise également que les expositions alimentaires présentées dans cet avis ne reflètent qu'une partie de l'exposition totale au TiO_2 par voie orale. Les autres contributeurs tels que les médicaments et les produits d'hygiène n'ont pas été considérés dans le cadre de ces travaux.

S'agissant de la méthodologie développée par l'Agence, son application à l'additif alimentaire E171 a permis de vérifier que cette méthodologie est adaptée à l'évaluation des risques de la fraction nanométrique des nanomatériaux utilisés comme additifs alimentaires. Cette mise en application au E171 a plus particulièrement permis :

a) de déterminer le taux de dissolution du TiO_2, ce dernier étant inférieur à 0,5% en masse dans les conditions du tractus gastro intestinal (pH acide et neutre), cela soutient la nécessité d'appliquer une méthodologie d'évaluation du risque nanospécifique à l'additif alimentaire E171 ;
b) de calculer, moyennant la formulation d'hypothèses de travail adaptées, des niveaux d'exposition pour différentes populations. Les calculs d'exposition passée des consommateurs français à l'additif alimentaire E171 et à sa fraction nanométrique révèlent que les enfants âgés de 1 à 9 ans étaient les plus exposés et que les niveaux d'exposition diminuaient avec l'âge. Les produits de boulangerie fine, les boissons aromatisées avec sucre et les desserts faisaient systématiquement partie des principaux contributeurs quelle que soit la classe d'âge ;
c) d'identifier différents effets potentiels associés à une exposition au TiO_2. Au vu de l'ensemble des résultats collectés et au même titre que l'EFSA, l'Anses n'est pas en mesure d'exclure le potentiel génotoxique de la fraction nanométrique du E171.

L'Agence souligne toutefois que les données à disposition n'ont pas permis de mener à terme cette évaluation pour permettre de conclure sur la caractérisation du risque de la fraction nanométrique du E171.

De l'application de sa méthodologie au cas spécifique du TiO_2, l'Agence tire des enseignements généraux pour l'évaluation du risque nanospécifique des nanomatériaux utilisés notamment comme additifs alimentaires. En premier lieu, elle souligne l'importance du test de dissolution, comme étape clé de sa méthodologie, pour statuer sur la nécessité de conduire une évaluation spécifique aux nanomatériaux. En second lieu, l'application rigoureuse des lignes directrices de l'OCDE apparaît indispensable pour conduire les études toxicologiques en appui à l'évaluation de ce risque, certaines de ces lignes directrices devant toutefois être adaptées à la spécificité des nanomatériaux.

Au final, les différentes phases de l'expertise de l'Anses relative aux nanomatériaux dans les produits destinés à l'alimentation ont d'abord conduit à identifier l'usage de nanomatériaux manufacturés dans différentes catégories d'aliments, notamment en tant qu'additifs alimentaires. Les motifs de recours à ces nanomatériaux sont variés, ils sont notamment utilisés pour l'amélioration de l'apparence du produit alimentaire (couleur, texture, structure) ou encore augmenter la biodisponibilité des nutriments. Les difficultés d'identification des nanomatériaux dans l'alimentation résultent de deux composantes principales :

- le niveau de technicité de la caractérisation physico-chimique des particules et le manque de standardisation pour leur détection ;
- une proposition de définition au niveau UE toujours très marquée par une convention autour de la proportion de formes nanos, sans lien avec les préoccupations sanitaires et ce, malgré les fortes attentes des consommateurs en termes de traçabilité, et les recommandations d'agences sanitaires telles que l'Anses ou d'autres comités scientifiques tels que le JRC[25] et le Scenihr[26].

Considérant les limites des approches conventionnelles en toxicologie et en évaluation de risques pour les substances qui se diffusent durablement dans l'organisme en restant sous forme nanométrique, l'Anses a proposé une méthode d'évaluation des risques associés à la présence de nanomatériaux manufacturés présents dans les aliments. L'Agence estime ainsi que la démonstration de sécurité d'un produit qui contient ces nanomatériaux requiert soit de s'assurer que son évaluation relève de la méthodologie standard d'évaluation des risques, dans la mesure où la dissolution des particules dans les conditions du tractus gastro-intestinal est totale, soit de déployer les différentes étapes de la méthodologie d'évaluation nanospécifique.

Le travail mené met en avant la rigueur nécessaire pour conduire une telle démonstration ainsi que le niveau de ressources et de données à mobiliser pour réaliser l'évaluation nanospécifique. Dans ce contexte, l'Agence va travailler avec ses homologues (dont l'EFSA)

[25] Joint Research Centre
[26] Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks

pour faire progresser les méthodologies d'évaluation du risque et harmoniser les protocoles de tests relatifs à la caractérisation physico-chimique et la toxicologie.

Enfin, l'application par l'Anses de sa méthodologie d'évaluation du risque à l'une des substances nanométriques les plus documentées utilisées en alimentation, le TiO_2, a montré à la fois son bien-fondé et le chemin restant à parcourir pour conclure, avec un niveau de robustesse suffisant, une évaluation de risque nano-spécifique. Ce constat renforce la position de l'Agence concernant la limitation des usages et des expositions aux nanomatériaux en favorisant l'utilisation de produits sûrs, dépourvus de nanomatériaux manufacturés, et en limitant ces usages à ceux considérés *in fine* comme dûment justifiés et faisant l'objet d'une démonstration documentée d'acceptabilité du risque.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

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

Food, methodology, manufactured nanomaterials, risk assessment.

CITATION SUGGEREE

Anses. (2022). Avis relatif à l'évaluation du risque de la fraction nanométrique de l'additif alimentaire E171(saisine 2016-SA-0226). Maisons-Alfort : Anses, 115 p.

BIBLIOGRAPHIE

Abdelazim SA, Darwish HA, Ali SA, Rizk MZ, Kadry MO. Potential antifibrotic and angiostatic impact of idebenone, carnosine and vitamin E in nano-sized titanium dioxide-induced liver injury. Cell Physiol Biochem. 2015;35(6):2402-11. doi: 10.1159/000374041.

Ammendolia MG, Iosi F, Maranghi F, Tassinari R, Cubadda F, Aureli F, Raggi A, Superti F, Mantovani A, De Berardis B. Short-term oral exposure to low doses of nano-sized TiO_2 and potential modulatory effects on intestinal cells. Food Chem Toxicol. 2017 Apr;102:63-75. doi: 10.1016/j.fct.2017.01.031.

Andreoli C, Leter G, De Berardis B, Degan P, De Angelis I, Pacchierotti F, Crebelli R, Barone F, Zijno A. Critical issues in genotoxicity assessment of TiO2 nanoparticles by human peripheral blood mononuclear cells. J Appl Toxicol. 2018 Dec;38(12):1471-1482. doi: 10.1002/jat.3650.

Anses 2019. Avis relatif aux risques liés à l'ingestion de l'additif alimentaire E171 (2019-SA-0036).

Anses 2020. Avis relatif aux nanomatériaux dans les produits destinés à l'alimentation (2016-SA-0226).

Anses 2021. Avis relatif à un guide d'évaluation du risque sanitaire spécifique aux nanomatériaux dans les produits destinés à l'alimentation (2016-SA-0226).

APE 2018. Analyse de nanoparticules dans les aliments. Agir pour l'environnement 2016. https://www.agirpourlenvironnement.org/communiques-presse/enquete-exclusive-des-analysesrevelent-la-presence-de-nanoparticules-dans-3980

Apopei P, Catrinescu C, Teodosiu C, Ungureanu A, Royer S. Selective dissolution of TiO2 crystalline phases: Physicochemical characterization and photocatalytic activity, Comptes Rendus Chimie, Volume 21, Issues 3–4, 2018, Pages 382-390.

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

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 FH, 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.

Blevins LK, Crawford RB, Bach A, Rizzo MD, Zhou J, Henriquez JE, Khan DMIO, Sermet S, Arnold LL, Pennington KL, Souza NP, Cohen SM, Kaminski NE. Evaluation of immunologic and intestinal effects in rats administered an E 171-containing diet, a food grade titanium dioxide (TiO_2). Food Chem Toxicol. 2019 Nov;133:110793. doi: 10.1016/j.fct.2019.110793.

Brandão F, Fernández-Bertólez N, Rosário F, Bessa MJ, Fraga S, Pásaro E, Teixeira JP, Laffon B, Valdiglesias V, Costa C. Genotoxicity of TiO2 Nanoparticles in Four Different Human Cell Lines (A549, HEPG2, A172 and SH-SY5Y). Nanomaterials (Basel). 2020 Feb 27;10(3):412. doi: 10.3390/nano10030412.

Brown DM, Danielsen PH, Derr R, Moelijker N, Fowler P, Stone V, Hendriks G, Møller P, Kermanizadeh A. The mechanism-based toxicity screening of particles with use in the food and nutrition sector via the ToxTracker reporter system. Toxicol *In vitro*. 2019 Dec;61:104594. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104594.

David Brusick, Marilyn Aardema, Larry Kier, David Kirkland & Gary Williams (2016) Genotoxicity Expert Panel review: weight of evidence evaluation of the genotoxicity of glyphosate, glyphosate-based formulations, and aminomethylphosphonic acid, Critical Reviews in Toxicology, 46:sup1, 56-74, DOI: 10.1080/10408444.2016.1214680

Cao X, Han Y, Gu M, Du H, Song M, Zhu X, Ma G, Pan C, Wang W, Zhao E, Goulette T, Yuan B, Zhang G and Xiao H. (2020). Food Additives: Foodborne Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Stronger Adverse Effects in Obese Mice than Non-Obese Mice: Gut Microbiota Dysbiosis, Colonic Inflammation, and Proteome Alterations (Small 36/2020). Small, 16: 2070199.

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.

Chen XX, Cheng B, Yang YX, Cao A, Liu JH, Du LJ, Liu Y, Zhao Y, Wang H. Characterization and preliminary toxicity assay of nano-titanium dioxide additive in sugar-coated chewing gum. Small. 2013 May 27;9(9-10):1765-74. doi: 10.1002/smll.201201506.

Cho WS, Kang BC, Lee JK, Jeong J, Che JH, Seok SH. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. Part Fibre Toxicol. 2013 Mar 26;10:9. doi: 10.1186/1743-8977-10-9.

Coméra C, Cartier C, Gaultier E, Catrice O, Panouille Q, El Hamdi S, Tirez K, Nelissen I, Théodorou V, Houdeau E. Jejunal villus absorption and paracellular tight junction permeability are major routes for early intestinal uptake of food-grade TiO_2 particles: an *in vivo* and ex vivo study in mice. Part Fibre Toxicol. 2020 Jun 11;17(1):26. doi: 10.1186/s12989-020-00357-z.

de la Calle I, Menta M, Klein M, Maxit B, Séby F. 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.

Dekanski D, Spremo-Potparević B, Bajić V, Živković L, Topalović D, Sredojević DN, Lazić V, Nedeljković JM. Acute toxicity study in mice of orally administrated TiO_2 nanoparticles functionalized with caffeic acid. Food Chem Toxicol. 2018 May;115:42-48. doi: 10.1016/j.fct.2018.02.064.

DGCCRF 2017. Contrôle de la présence de nanoparticules dans les produits alimentaires et les cosmétiques menés par la DGCCRF.

Dorier M, Béal D, Marie-Desvergne C, Dubosson M, Barreau F, Houdeau E, Herlin-Boime N, Carriere M. 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.

Du X, Gao S, Hong L, Zheng X, Zhou Q, Wu J. Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the mouse lymphoma assay and the Ames test. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2019 Feb;838:22-27. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.11.015.

Dudefoi W, Terrisse H, Richard-Plouet M, Gautron E, Popa F, Humbert B, Ropers MH. 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 May;34(5):653-665. doi: 10.1080/19440049.2017.1284346.

Dudefoi W, Terrisse H, Popa AF, Gautron E, Humbert B, Ropers MH. Evaluation of the content of TiO_2 nanoparticles in the coatings of chewing gums. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2018 Feb;35(2):211-221. doi: 10.1080/19440049.2017.1384576.

Ebrahimzadeh Bideskan A, Mohammadipour A, Fazel A, Haghir H, Rafatpanah H, Hosseini M, Rajabzadeh A. Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy and lactation alters offspring hippocampal mRNA BAX and Bcl-2 levels, induces apoptosis and decreases neurogenesis. Exp Toxicol Pathol. 2017 Jul 5;69(6):329-337. doi: 10.1016/j.etp.2017.02.006.

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

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

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

Farrell TP, Magnuson B. Absorption, Distribution and Excretion of Four Forms of Titanium Dioxide Pigment in the Rat. J Food Sci. 2017 Aug;82(8):1985-1993. doi: 10.1111/1750-3841.13791.

Fiordaliso F, Foray C, Salio M, Salmona M, Diomede L. Realistic Evaluation of Titanium Dioxide Nanoparticle Exposure in Chewing Gum. J Agric Food Chem. 2018 Jul 5;66(26):6860-6868. doi: 10.1021/acs.jafc.8b00747.

Fresegna AM, Ursini CL, Ciervo A, Maiello R, Casciardi S, Iavicoli S, Cavallo D. Assessment of the Influence of Crystalline Form on Cyto-Genotoxic and Inflammatory Effects Induced by TiO2 Nanoparticles on Human Bronchial and Alveolar Cells. Nanomaterials (Basel). 2021 Jan 19;11(1):253. doi: 10.3390/nano11010253.

Gao Y, Ye Y, Wang J, Zhang H, Wu Y, Wang Y, Yan L, Zhang Y, Duan S, Lv L, Wang Y. Effects of titanium dioxide nanoparticles on nutrient absorption and metabolism in rats: distinguishing the susceptibility of amino acids, metal elements, and glucose. Nanotoxicology. 2020 Dec;14(10):1301-1323. doi: 10.1080/17435390.2020.1817597.

García-Rodríguez A, Vila L, Cortés C, Hernández A, Marcos R. Effects of differently shaped TiO_2NPs (nanospheres, nanorods and nanowires) on the *in vitro* model (Caco-2/HT29) of the intestinal barrier. Part Fibre Toxicol. 2018 Aug 7;15(1):33. doi: 10.1186/s12989-018-0269-x.

Gea M, Bonetta S, Iannarelli L, Giovannozzi AM, Maurino V, Bonetta S, Hodoroaba VD, Armato C, Rossi AM, Schilirò T. Shape-engineered titanium dioxide nanoparticles (TiO2-NPs): cytotoxicity and genotoxicity in bronchial epithelial cells. Food Chem Toxicol. 2019 May;127:89-100. doi: 10.1016/j.fct.2019.02.043.

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

Gonzalez L, Sanderson BJS, Kirsch-Volders M, Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials, Mutagenesis, Volume 26, Issue 1, January 2011, Pages 185–191,

Grissa I, Elghoul J, Ezzi L, Chakroun S, Kerkeni E, Hassine M, El Mir L, Mehdi M, Ben Cheikh H, Haouas Z. Anemia and genotoxicity induced by sub-chronic intragastric treatment of rats with titanium dioxide nanoparticles. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015 Dec;794:25-31. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.09.005.

Grissa I, Ezzi L, Chakroun S, Mabrouk A, Saleh AB, Braham H, Haouas Z, Cheikh HB. Rosmarinus officinalis L. ameliorates titanium dioxide nanoparticles and induced some toxic effects in rats' blood. Environ Sci Pollut Res Int. 2017 May;24(13):12474-12483. doi: 10.1007/s11356-017-8848-1.

Grissa I, Guezguez S, Ezzi L, Chakroun S, Sallem A, Kerkeni E, Elghoul J, El Mir L, Mehdi M, Cheikh HB, Haouas Z. The effect of titanium dioxide nanoparticles on neuroinflammation response in rat brain. Environ Sci Pollut Res Int. 2016 Oct;23(20):20205-20213. doi: 10.1007/s11356-016-7234-8.

Grissa I, ElGhoul J, Mrimi R, El Mir L, Ben Cheikh H, Horcajada P. In deep evaluation of the neurotoxicity of orally administered TiO2 nanoparticles,Brain Research Bulletin, Volume 155, 2020, Pages 119-128.

Guide décrivant les catégories alimentaires dans le règlement CE n° 1333/2008 Annexe II partie E version 5 (2017).

Hamada, S., Shigano, M., Kawakami, S. et al. Evaluation of the novel liver micronucleus assay using formalin-fixed tissues. Genes and Environ 41, 13 (2019).

Heo MB, Kwak M, An KS, Kim HJ, Ryu HY, Lee SM, Song KS, Kim IY, Kwon JH, Lee TG. Oral toxicity of titanium dioxide P25 at repeated dose 28-day and 90-day in rats. Part Fibre Toxicol. 2020 Jul 17;17(1):34. doi: 10.1186/s12989-020-00350-6.

Hong F, Wang L. Nanosized titanium dioxide-induced premature ovarian failure is associated with abnormalities in serum parameters in female mice. Int J Nanomedicine. 2018 Apr 27;13:2543-2549. doi: 10.2147/IJN.S151215.

Hong F, Zhou Y, Zhao X, Sheng L, Wang L. Maternal exposure to nanosized titanium dioxide suppresses embryonic development in mice. Int J Nanomedicine. 2017 Aug 24;12:6197-6204. doi: 10.2147/IJN.S143598.

Hong J, Wang L, Zhao X, Yu X, Sheng L, Xu B, Liu D, Zhu Y, Long Y, Hong F. Th2 factors may be involved in TiO_2 NP-induced hepatic inflammation. J Agric Food Chem. 2014 Jul 16;62(28):6871-8. doi: 10.1021/jf501428w.

Hu H, Guo Q, Wang C, Ma X, He H, Oh Y, Feng Y, Wu Q, Gu N. Titanium dioxide nanoparticles increase plasma glucose via reactive oxygen species-induced insulin resistance in mice. J Appl Toxicol. 2015 Oct;35(10):1122-32. doi: 10.1002/jat.3150.

Hu H, Li L, Guo Q, Jin S, Zhou Y, Oh Y, Feng Y, Wu Q, Gu N. A mechanistic study to increase understanding of titanium dioxide nanoparticles-increased plasma glucose in mice. Food Chem Toxicol. 2016 Sep;95:175-87. doi: 10.1016/j.fct.2016.07.010.

Hu H, Li L, Guo Q, Zong H, Yan Y, Yin Y, Wang Y, Oh Y, Feng Y, Wu Q, Gu N. RNA sequencing analysis shows that titanium dioxide nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress, which has a central role in mediating plasma glucose in mice. Nanotoxicology. 2018 May;12(4):341-356. doi: 10.1080/17435390.2018.1446560.

Hu H, Zhang B, Li L, Guo Q, Yang D, Wei X, Fan X, Liu J, Wu Q, Oh Y, Feng Y, Chen K, Wang C, Hou L, Gu N. The toxic effects of titanium dioxide nanoparticles on plasma glucose metabolism are more severe in developing mice than in adult mice. Environ Toxicol. 2020 Apr;35(4):443-456. doi: 10.1002/tox.22880.

Janer G, Mas del Molino E, Fernández-Rosas E, Fernández A, Vázquez-Campos S. Cell uptake and oral absorption of titanium dioxide nanoparticles. Toxicol Lett. 2014 Jul 15;228(2):103-10. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.04.014.

Jensen DM, Løhr M, Sheykhzade M, Lykkesfeldt J, Wils RS, Loft S, Møller P. Telomere length and genotoxicity in the lung of rats following intragastric exposure to food-grade titanium dioxide and vegetable carbon particles. Mutagenesis. 2019 May 29;34(2):203-214. doi: 10.1093/mutage/gez003.

Jensen, D.M., Christophersen, D.V., Sheykhzade, M. *et al.* Vasomotor function in rat arteries after ex vivo and intragastric exposure to food-grade titanium dioxide and vegetable carbon particles. *Part Fibre Toxicol* 15**,** 12 (2018).

Jo MR, Yu J, Kim HJ, Song JH, Kim KM, Oh JM, Choi SJ. Titanium Dioxide Nanoparticle-Biomolecule Interactions Influence Oral Absorption. Nanomaterials (Basel). 2016 Nov 29;6(12):225. doi: 10.3390/nano6120225.

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.

Kazimirova A, El Yamani N, Rubio L, García-Rodríguez A, Barancokova M, Marcos R, Dusinska M. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on the Hprt Gene Mutations in V79 Hamster Cells. Nanomaterials (Basel). 2020 Mar 5;10(3):465. doi: 10.3390/nano10030465.

Kazimirova A, Baranokova M, Staruchova M, Drlickova M, Volkovova K, Dusinska M. Titanium dioxide nanoparticles tested for genotoxicity with the comet and micronucleus assays *in vitro*, ex vivo and *in vivo*, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 843, 2019, Pages 57-65.

Kim N, Kim C, Jung S, Park Y, Lee Y, Jo J, Hong M, Lee S, Oh Y, Jung K. 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 Jul;35(7):1238-1246. doi: 10.1080/19440049.2018.1482011.

Kreyling WG, Holzwarth U, Schleh C, Kozempel J, Wenk A, Haberl N, Hirn S, Schäffler M, Lipka J, Semmler-Behnke M, Gibson N. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. Nanotoxicology. 2017 May;11(4):443-453. doi: 10.1080/17435390.2017.1306893.

Lee J, Jeong JS, Kim SY, Park MK, Choi SD, Kim UJ, Park K, Jeong EJ, Nam SY, Yu WJ. Titanium dioxide nanoparticles oral exposure to pregnant rats and its distribution. Part Fibre Toxicol. 2019 Jul 18;16(1):31. doi: 10.1186/s12989-019-0313-5.

Lim JH, Sisco P, Mudalige TK, Sánchez-Pomales G, Howard PC, Linder SW. Detection and characterization of SiO2 and TiO2 nanostructures in dietary supplements. J Agric Food Chem. 2015 Apr 1;63(12):3144-52. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00392.

Lim JH, Bae D, Fong A. Titanium Dioxide in Food Products: Quantitative Analysis Using ICPMS and Raman Spectroscopy. J Agric Food Chem. 2018 Dec 26;66(51):13533-13540. doi: 10.1021/acs.jafc.8b06571.

Lomer MC, Thompson RP, Commisso J, Keen CL, Powell JJ. Determination of titanium dioxide in foods using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Analyst. 2000 Dec;125(12):2339-43. doi: 10.1039/b006285p.

López-Heras, I. Madrid Y, Cámara C. 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.

Martins ADC Jr, Azevedo LF, de Souza Rocha CC, Carneiro MFH, Venancio VP, de Almeida MR, Antunes LMG, de Carvalho Hott R, Rodrigues JL, Ogunjimi AT, Adeyemi JA, Barbosa F Jr. Evaluation of distribution, redox parameters, and genotoxicity in Wistar rats co-exposed to silver and titanium dioxide nanoparticles. J Toxicol Environ Health A. 2017;80(19-21):1156-1165. doi: 10.1080/15287394.2017.1357376..

Modrzynska J, Berthing T, Ravn-Haren G, Kling K, Mortensen A, Rasmussen RR, Larsen EH, Saber AT, Vogel U, Loeschner K. *In vivo*-induced size transformation of cerium oxide nanoparticles in both lung and liver does not affect long-term hepatic accumulation following pulmonary exposure. PLoS One. 2018 Aug 20;13(8):e0202477. doi: 10.1371/journal.pone.0202477.

Mohamed HR. Estimation of TiO_2 nanoparticle-induced genotoxicity persistence and possible chronic gastritis-induction in mice. Food Chem Toxicol. 2015 Sep;83:76-83. doi: 10.1016/j.fct.2015.05.018.

Mohammadipour A, Fazel A, Haghir H, Motejaded F, Rafatpanah H, Zabihi H, Hosseini M, Bideskan AE. Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring. Environ Toxicol Pharmacol. 2014 Mar;37(2):617-25. doi: 10.1016/j.etap.2014.01.014.

Mohammadipour A, Hosseini M, Fazel A, Haghir H, Rafatpanah H, Pourganji M, Bideskan AE. The effects of exposure to titanium dioxide nanoparticles during lactation period on learning and memory of rat offspring. Toxicol Ind Health. 2016 Feb;32(2):221-8. doi: 10.1177/0748233713498440.

Mohammed ET, Safwat GM. Grape Seed Proanthocyanidin Extract Mitigates Titanium Dioxide Nanoparticle (TiO_2-NPs)-Induced Hepatotoxicity Through TLR-4/NF-κB Signaling Pathway. Biol Trace Elem Res. 2020 Aug;196(2):579-589. doi: 10.1007/s12011-019-01955-5.

Moradi A, Ziamajidi N, Ghafourikhosroshahi A, Abbasalipourkabir R. Effects of vitamin A and vitamin E on attenuation of titanium dioxide nanoparticles-induced toxicity in the liver of male Wistar rats. Mol Biol Rep. 2019 Jun;46(3):2919-2932. doi: 10.1007/s11033-019-04752-4.

Mortensen NP, Pathmasiri W, Snyder RW, Moreno Caffaro M, Watson SL, Patel PR, Beeravalli L, Prattipati S, Aravamudhan S, Sumner SJ, Fennell TR. Part Fibre Toxicol 19, 3 (2022).

Murugadoss S, Brassinne F, Sebaihi N, Petry J, Cokic SM, Van Landuyt KL, Godderis L, Mast J, Lison D, Hoet PH, van den Brule S. Agglomeration of titanium dioxide nanoparticles increases toxicological responses *in vitro* and *in vivo*. Part Fibre Toxicol. 2020 Feb 26;17(1):10. doi: 10.1186/s12989-020-00341-7.

Nie P, Wang M, Zhao Y, Liu S, Chen L, Xu H. Protective Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on TiO_2 Nanoparticles-Induced Oxidative Stress Damage in the Liver of Young Rats. Nanomaterials (Basel). 2021 Mar 21;11(3):803. doi: 10.3390/nano11030803.

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.

O'neil M.J. (ed.). 2013. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK:Royal Society of Chemistry,. 1755 p.

Peters RJ, van Bemmel G, Herrera-Rivera Z, Helsper HP, Marvin HJ, Weigel S, Tromp PC, Oomen AG, Rietveld AG, Bouwmeester H. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. J Agric Food Chem. 2014 Jul 9;62(27):6285-93. doi: 10.1021/jf5011885.

Pinget G, Tan J, Janac B, Kaakoush NO, Angelatos AS, O'Sullivan J, Koay YC, Sierro F, Davis J, Divakarla SK, Khanal D, Moore RJ, Stanley D, Chrzanowski W, Macia L. Impact of the Food Additive Titanium Dioxide (E171) on Gut Microbiota-Host Interaction. Front Nutr. 2019 May 14;6:57. doi: 10.3389/fnut.2019.00057. Erratum in: Front Nutr. 2019 Jul 02;6:100.

Proquin H, Jetten MJ, Jonkhout MCM, Garduño-Balderas LG, Briedé JJ, de Kok TM, Chirino YI, van Loveren H. Time course gene expression data in colon of mice after exposure to food-grade E171. Data Brief. 2017 Nov 22;16:531-600. doi: 10.1016/j.dib.2017.11.067.

Proquin H, Jetten MJ, Jonkhout MCM, Garduño-Balderas LG, Briedé JJ, de Kok TM, Chirino YI, van Loveren H. Gene expression profiling in colon of mice exposed to food additive titanium dioxide (E171). Food Chem Toxicol. 2018 Jan;111:153-165. doi: 10.1016/j.fct.2017.11.011.

Proquin, H., Jetten, M.J., Jonkhout, M.C.M. et al. Transcriptomics analysis reveals new insights in E171-induced molecular alterations in a mouse model of colon cancer. Sci Rep 8, 9738 (2018).

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.

Règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires.

Rompelberg C, Heringa MB, van Donkersgoed G, Drijvers J, Roos A, Westenbrink S, Peters R, van Bemmel G, Brand W, Oomen AG. Oral intake of added titanium dioxide and its nanofraction from food products, food supplements and toothpaste by the Dutch population. Nanotoxicology. 2016 Dec;10(10):1404-1414. doi: 10.1080/17435390.2016.1222457.

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.

Sharif H, Rasha AAE, Ramia Z Al-B. Titanium dioxide content in foodstuffs from the Jordanian market: Spectrophotometric evaluation of TiO2 nanoparticles. International Food Research Journal, 2015.22(3): p. 1024.

Shukla RK, Kumar A, Vallabani NV, Pandey AK, Dhawan A. Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. Nanomedicine (Lond). 2014 Jul;9(9):1423-34. doi: 10.2217/nnm.13.100.

Sofranko A, Wahle T, Heusinkveld HJ, Stahlmecke B, Dronov M, Pijnenburg D, Hilhorst R, Lamann K, Albrecht C, Schins RPF. Evaluation of the neurotoxic effects of engineered nanomaterials in C57BL/6J mice in 28-day oral exposure studies. Neurotoxicology. 2021 May;84:155-171. doi: 10.1016/j.neuro.2021.03.005.

Sohal IS, Cho YK, O'Fallon KS, Gaines P, Demokritou P, Bello D. Dissolution Behavior and Biodurability of Ingested Engineered Nanomaterials in the Gastrointestinal Environment. ACS Nano. 2018 Aug 28;12(8):8115-8128. doi: 10.1021/acsnano.8b02978.

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

Sycheva LP, Zhurkov VS, Iurchenko VV, Daugel-Dauge NO, Kovalenko MA, Krivtsova EK, Durnev AD. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. Mutat Res. 2011 Nov 27;726(1):8-14. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.07.010.

Taboada-López MV, Herbello-Hermelo P, Domínguez-González R, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICPMS. Talanta. 2019 Apr 1;195:23-32. doi: 10.1016/j.talanta.2018.11.023.

Talamini L, Gimondi S, Violatto MB, Fiordaliso F, Pedica F, Tran NL, Sitia G, Aureli F, Raggi A, Nelissen I, Cubadda F, Bigini P, Diomede L. Repeated administration of the food additive E171 to mice results in accumulation in intestine and liver and promotes an inflammatory status. Nanotoxicology. 2019 Oct;13(8):1087-1101. doi: 10.1080/17435390.2019.1640910.

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. Food-grade TiO_2 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 Nanobiotechnology. 2018 Jun 19;16(1):53. doi: 10.1186/s12951-018-0379-5.

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. Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. Nanotoxicology. 2014 Sep;8(6):654-62. doi: 10.3109/17435390.2013.822114.

Toda T, Yoshino S. Amorphous nanosilica particles block induction of oral tolerance in mice. J Immunotoxicol. 2016 Sep;13(5):723-8. doi: 10.3109/1547691X.2016.1171266.

Urrutia-Ortega IM., Garduño-Balderas LG., Delgado-Buenrostro NL., Freyre-Fonseca V., FloresFlores 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.

Vanhauwaert A, Vanparys P, Kirsch-Volders M. The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. Mutagenesis. 2001 Jan;16(1):39-50. doi: 10.1093/mutage/16.1.39.

Verleysen E, Waegeneers N, Brassinne F, De Vos S, Jimenez IO, Mathioudaki S, Mast J. Physicochemical Characterization of the Pristine E171 Food Additive by Standardized and Validated Methods. Nanomaterials (Basel). 2020 Mar 24;10(3):592. doi: 10.3390/nano10030592.

Vila L, García-Rodríguez A, Marcos R, Hernández A. Titanium dioxide nanoparticles translocate through differentiated Caco-2 cell monolayers, without disrupting the barrier functionality or inducing genotoxic damage. J Appl Toxicol. 2018 Sep;38(9):1195-1205. doi: 10.1002/jat.3630.

Wang J, Wang J, Liu Y, Nie Y, Si B, Wang T, Waqas A, Zhao G, Wang M, Xu A. Aging-independent and size-dependent genotoxic response induced by titanium dioxide nanoparticles in mammalian cells. J Environ Sci (China). 2019 Nov;85:94-106. doi: 10.1016/j.jes.2019.04.024.

Wang Y, Chen Z, Ba T, Pu J, Chen T, Song Y, Gu Y, Qian Q, Xu Y, Xiang K, Wang H, Jia G. Susceptibility of young and adult rats to the oral toxicity of titanium dioxide nanoparticles. Small. 2013 May 27;9(9-10):1742-52. doi: 10.1002/smll.201201185.

Warheit DB, Brown SC, Donner EM. Acute and subchronic oral toxicity studies in rats with nanoscale and pigment grade titanium dioxide particles. Food Chem Toxicol. 2015 Oct;84:208-24. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.026.

Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. Environ Sci Technol. 2012 Feb 21;46(4):2242-50. doi: 10.1021/es204168d. Epub 2012 Feb 8.

Yang Y, Doudrick K, Bi X, Hristovski K, Herckes P, Westerhoff P, Kaegi R. Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles. Environ Sci Technol. 2014 Jun 3;48(11):6391-400. doi: 10.1021/es500436x.

Yao L, Chen L, Chen B, Tang Y, Zhao Y, Liu S, Xu H. Toxic effects of TiO_2 NPs in the blood-milk barrier of the maternal dams and growth of offspring. Ecotoxicol Environ Saf. 2021 Jan 15;208:111762. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111762.

Yao L, Tang Y, Chen B, Hong W, Xu X, Liu Y, Aguilar ZP, Xu H. Oral exposure of titanium oxide nanoparticles induce ileum physical barrier dysfunction via Th1/Th2 imbalance. Environ Toxicol. 2020 Sep;35(9):982-990. doi: 10.1002/tox.22934.

Yin C, Zhao W, Liu R, Liu R, Wang Z, Zhu L, Chen W, Liu S. TiO_2 particles in seafood and surimi products: Attention should be paid to their exposure and uptake through foods. Chemosphere. 2017 Dec;188:541-547. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.168.

Zhang L, Xie X, Zhou Y, Yu D, Deng Y, Ouyang J, Yang B, Luo D, Zhang D, Kuang H. Gestational exposure to titanium dioxide nanoparticles impairs the placentation through dysregulation of vascularization, proliferation and apoptosis in mice. Int J Nanomedicine. 2018 Feb 5;13:777-789. doi: 10.2147/IJN.S152400.

Zhang S, Jiang X, Cheng S, Fan J, Qin X, Wang T, Zhang Y, Zhang J, Qiu Y, Qiu J, Zou Z, Chen C. Titanium dioxide nanoparticles via oral exposure leads to adverse disturbance of gut microecology and locomotor activity in adult mice. Arch Toxicol. 2020 Apr;94(4):1173-1190. doi: 10.1007/s00204-020-02698-2.

Zhang Y, Duan S, Liu Y, Wang Y. The combined effect of food additive titanium dioxide and lipopolysaccharide on mouse intestinal barrier function after chronic exposure of titanium dioxide-contained feedstuffs. Part Fibre Toxicol 18, 8 (2021).

Zhou Y, Ji J, Hong F, Zhuang J, Wang L. Maternal Exposure to Nanoparticulate Titanium Dioxide Causes Inhibition of Hippocampal Development Involving Dysfunction of the Rho/NMDAR Signaling Pathway in Offspring. J Biomed Nanotechnol. 2019 Apr 1;15(4):839-847. doi: 10.1166/jbn.2019.2723.

ANNEXE 1 : PRESENTATIONS DES INTERVENANTS

Présentation des intervenants

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

GROUPE DE TRAVAIL NANO ET ALIMENTATION

Président

M. Fabrice NESSLANY – Chef du service de toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille – toxicologie, génotoxicité et évaluation des risques. M. NESSALNY a participé au GT de juin 2017 à novembre 2021.

Vice-président

M. Emmanuel FLAHAUT – Directeur de recherche au centre national de la recherche scientifique (CNRS) – physico-chimie, écotoxicologie. M FLAHAUT est devenu président en novembre 2021.

Membres

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

CES Evaluation des risques chimiques liés aux aliments (2018-2022)

Président

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

Vice-présidents

M. Fabrice NESSLANY (jusqu'en décembre 2021) – Chef du service de toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille. Toxicologie, génotoxicité et évaluation des risques.

Mme Karine TACK (jusqu'en août 2021) – IRSN, Responsable de laboratoire. Chimie analytique.

M. David MAKOWSKI (depuis décembre 2021) – INRAE, Directeur de recherche – Statistiques, modélisation

Membres

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

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

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

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

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

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

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

Mme Anne-Sophie FICHEUX (depuis décembre 2021) – Ingénieure de recherche – Université de Bretagne Occidentale - Toxicologie alimentaire, modélisation et exposition probabiliste.

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

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

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

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

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

M. Michel LAURENTIE (depuis décembre 2021) – Directeur de recherche – ANSES, Unité « Expérimentation, modélisation et analyse des données » - Pharmacocinétique, modélisation mathématique.

Mme Raphaële LE GARREC (jusqu'en août 2021) – Université de Bretagne Occidentale, Maître de conférences - compétences en toxicologie, biotoxines et réglementation.

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

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

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

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

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

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

Mme Anne PLATEL (depuis décembre 2021) - Maître de conférences des universités - Institut Pasteur de Lille– Toxicologie, toxicologie génétique et toxicologie règlementaire.

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

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

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

PARTICIPATION ANSES

La coordination scientifique du projet a été assurée par l'Unité d'Évaluation des Risques liés aux Aliments (UERALIM) sous la direction de : M. Moez Sanaa, chef d'unité jusqu'en septembre 2021, Mme Nathalie Arnich, cheffe d'unité par intérim d'octobre 2021 à mars 2022 puis Mme Hélène Gayon, cheffe d'unité depuis avril 2022.

Coordination scientifique

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

Contribution scientifique

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

Mme Fanny DEBIL – Chargée de projets en sciences sociales – Mission sciences sociales, expertise et société (MiSSES) – Anses.

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Anses.

ANNEXE 2 : EQUATIONS DE RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Equation de recherché pour les données *in vivo*

("titanium dioxide nanoparticles" or "titanium dioxide nanomaterial" or "TiO2 nanoparticles“ or "TiO2 nanomaterial" or "E171" or "E171" or "food grade titanium dioxide" or "food grade TiO2" or " nanoparticulate titanium dioxide" or "nanoparticulate TiO2" or "nanosized TiO2" or "nano-sized TiO2" or "nanosized titanium dioxide" or "nano-sized titanium dioxide") and ("oral" or "gavage" or "per os" or "diet") and ("translocation" or "toxicokinetics" or "kinetics" or "accumulation" or "uptake" or "ADME" or "absorption" or "distribution" or "metabolism" or "excretion" or "fate" or "organ burden" or "systemic exposure" or "bioavailability" or "localization" or "chronic" or "subchronic" or "long term" or "repeated" or "short term" or "14 days" or "28 days" or "90 days" or "14-day" or "28-day" or "90-day" or "prenatal" or "perinatal" or "postnatal" or "neoplastic" or "preneoplastic" or "precancerous" or "foci" or "ACF" or "MCF" or "BCAC" or "neoplasia" or "immune" or "inflammation" or "inflammatory" or "proinflammatory" or "galt" or "lymphoid" or "lymphocyte" or "T cells" or "T reg" or "immune" or "macrophage" or "antigen presenting cells" or "dendritic cells" or "ploidy" or "neural" or "neuro*" or "nervous" or "brain" or "reproduction" or "teratogen" or "offspring" or "maternal" or "development" or "fertility" or "fecundity" or "pup" or "sexual" or "estrous" or "pubertal" or "pregnan*" or "hormonal" or "gestation" or "carcino*" or "cancer" or "tumor" or "allerg*" or "food intolerance" or "toxic*" or "tissue" or "health" or "hepatotox*" or "nephrotox*" or "liver" or "kidney" or "spleen" or "thymus" or "intestine*" or "gut" or "colon" or "bowel" or "testi*" or "ovar*" or "gonade" or "disease") not ("drug delivery"[Title/Abstract] or "drug release*"[Title/Abstract] or "antibacterial"[Title/Abstract] or "antimicrob*"[Title/Abstract] or "anticancer*"[Title/Abstract])

Equation de recherché pour les données de géntotoxicité *in vitro*

("titanium dioxide nanoparticles" or "titanium dioxide nanomaterial" or "TiO2 nanoparticles“ or "TiO2 nanomaterial" or "E171" or "E171" or "food grade titanium dioxide" or "food grade TiO2" or " nanoparticulate titanium dioxide" or "nanoparticulate TiO2" or "nanosized TiO2" or "nano-sized TiO2" or "nanosized titanium dioxide" or "nano-sized titanium dioxide") and ("vitro") and ("genotoxic*" or "mutagen*" or "mutation" or "aneu*“ or “clastogen*“ or “DNA damage”)

ANNEXE 3 : ETUDES TOXICOLOGIQUES SELECTIONEES ET ANALYSEES PAR LE GT

Publications	Résumé	Commentaires du GT
Abdelazim *et al.* (2015)	Des souris ont été exposées à du nanoTiO_2 de 21 nm pendant 2 semaines à une dose de 150 mg (kg pc)$^{-1}$. Les auteurs ont observé une augmentation du poids relatif du foie, du taux sérique des aspartate aminotransferase (AST) et alanine aminotransferase (ALT), de la capacité antioxydante du foie et des niveaux de nitrates/nitrites. En parallèle, les auteurs observent une diminution de l'activité glutathione-S-transferase (GST) et une modulation de l'expression génique et protéique du Transforming Growth Factor Beta (TGF-B1), de smad2 et du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Une fibrose hépatique sévère avec infiltration massive de fibres de collagènes est également rapportée.	Le GT relève une incohérence sur les nombre d'animaux traités (au départ 20 animaux par groupe mais ensuite seulement 10 analysés par endpoint). Le schéma de traitement pour le groupe traité avec le nanoTiO_2 n'est pas clair : administration journalière pendant 2 semaines mais ensuite ? Récupération pendant 1 mois ?. Absence de quantification des altérations histologiques.
Andreoli *et al.* (2018)	Cet article rapporte les effets de nanoTiO_2 anatase (sphériques 20-60 nm), rutiles (bâtonnets 30x100 nm), mixtes anatase/rutile (sphériques 45-262 nm) ainsi que de microparticules rutiles (sphériques 50-3000 nm) sur des cellules mononucléées sanguines périphériques humaines (PBMC), issues de couches leuco-plaquettaires (buffy coats), qui sont un mélange de lymphocytes et de monocytes. Les particules induisent une réponse génotoxique selon le test des comètes lorsque les cellules sont exposées à 50, 100 et 200 µg/mL (anatases et anatases/rutiles) ou à 100 et 200 µg/mL (rutiles) pendant 24h. Ces particules conduisent également à une augmentation du niveau de 8-oxo-dGuo (base oxydée de l'ADN) dans l'ADN des PBMC, dès 6h d'exposition à 100 ou 200 µg/mL de TiO_2, quelle que soit la phase cristalline et la taille. Une analyse en cytométrie en flux montre l'interaction préférentielle des TiO_2 avec les monocytes, qui s'y accumulent dès 30 min de contact, alors que les lymphocytes n'ont pas accumulé de TiO_2 après 2h de contact. Les auteurs montrent également une élévation du niveau intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les monocytes mais pas dans les lymphocytes. Enfin, le test du micronoyau est mené selon la ligne directrice OCDE TG 487 sur les PBMC dont les lymphocytes sont stimulés *in vitro* (2% phytohemagglutinine) et ne met pas en évidence de dommages chromosomiques à des concentrations de particules allant jusqu'à 100 µg/mL. Lorsque les cellules sont traitées avec 200 µg/mL de particules, les résultats ne sont pas exploitables car	Le GT note que la génotoxicité n'est testée que jusqu'à 200 µg/mL, les auteurs justifient ce choix par le fait qu'à plus forte concentration, les agglomérats de TiO_2 s'accumulant dans les cellules empêchent de détecter et de compter convenablement les micronoyaux. L'accumulation cellulaire des nanoparticules n'est pas documentée. En ce qui concerne les autres tests, le niveau de comètes observé reste peu élevé (4,5% pour le tail DNA maximum, alors que les auteurs obtiennent ~30% dans les contrôles positifs), cela pose la question de la pertinence physiologique d'un si faible niveau de dommages.

	l'observation des micronoyaux est rendue difficile par l'interférence optique des particules.	
Ammendolia *et al.* (2017)	Des rats mâles et femelles ont été traités 5 jours par voie orale par gavage à deux doses de nanoparticules sphériques de TiO_2 anatase (1 et 2 mg (kg pc)$^{-1}$) dont la taille varie de 20 à 60 nm. Les auteurs ont observé la présence de titane dans la paroi du petit intestin, une augmentation de la taille des villosités de l'épithélium et du nombre de cellules à mucus (chez le mâle uniquement). *In vitro*, aucun effet cytotoxique temps- ou dose-dépendant n'a été observé. Un stress oxydant est apparu à 6h d'incubation mais inconstant car non retrouvé après 24h d'incubation excepté à la concentration la plus forte. Les tests sur le potentiel de membrane des mitochondries sont apparus sans effet. En MET, de petits agrégats et des agglomérats compacts de particules de TiO_2 ont été retrouvées dans le cytoplasme des cellules épithéliales coliques HT-29 dès les temps courts d'incubation (2-6h), souvent dans des mitochondries, plus rarement dans les noyaux. Aucune altération structurale des cellules n'a été observée. Compte tenu du dimorphisme sexuel sur la morphologie de l'épithélium et sur le nombre de cellules à mucus, des tests doses-effet *in vitro* en prolifération cellulaire ont été réalisés sur la lignée épithéliale colique HT-29, en présence et l'absence de testostérone (hormone prépondérante chez le mâle) ou d'Insulin-like Growth factor (IGF-1), un facteur de croissance cellulaire régulé par la testostérone. Ainsi les auteurs ont montré une stimulation par les nanoparticules de TiO_2 de la prolifération cellulaire des cellules humaines du côlon en présence de testostérone après 48h de traitement. Cet effet est plus prononcé aux faibles concentrations de TiO_2. En présence d'IGF-1, un effet prolifératrice a également été observé après 6h d'incubation pour la plus faible concentration de nanoparticules de TiO_2, quand il tend à se généraliser pour les autres doses après 48h d'exposition.	Les études ont été réalisées selon les lignes directrices de l'OCDE et en suivant les bonnes pratiques de laboratoire. L'étude *in vivo* chez le rat est trop courte (5 jours) pour conclure à un effet chronique sur la morphologie des cellules de l'épithélium et l'effet prolifératrice sur celles à mucus. De plus, le stade du cycle sexuel chez les femelles n'est pas renseigné au moment du sacrifice, ce qui rend difficile l'interprétation d'un effet essentiellement observé chez les mâles avec seulement 10 animaux par groupe (contrôle hormonal par les œstrogènes sur la prolifération cellulaire, ou encore la perméabilité de l'épithélium intestinal, très variable chez la rate selon le stade œstral). Les approches *in vitro* en présence de testostérone ou d'IGF-1 auraient nécessité l'utilisation d'agents bloqueurs des récepteurs de ces hormones pour une approche pharmacologique fiable et conclusive (beaucoup d'hypothèses dans la discussion, principalement que l'interaction des nanoparticules avec les structures intracellulaires faciliterait l'action/l'accès de la testostérone ou de l'IGF-1 aux cellules, non montré ici). A noter qu'aucun dosage d'hormone sérique ne vient appuyer leur hypothèse première.
Blevins *et al.* (2019)	Des rats ont été exposés à du E171 (moyenne 110-115 nm et 36% de particules < 100 nm) à des niveaux de doses de 40, 400 et 5000 ppm dans les aliments ce qui correspond à des niveaux d'exposition de 3,9 ; 25,5 et 294 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Ces niveaux d'exposition fluctuent selon le groupe traité et au cours du temps. Les auteurs relèvent une augmentation statistiquement significative du nombre de foyers de crypte aberrante (FCA) et du nombre de cryptes aberrantes par foyer (ABC) chez les rats traités uniquement avec de la DMH à 180 mg (kg pc)$^{-1}$. Ce résultat est logique et attendu car la DMH est utilisée pour initier les processus de cancérogenèse. Les auteurs ne relèvent pas d'augmentation statistiquement significative du nombre de FCA ni du nombre de cryptes aberrantes par foyer au niveau du côlon de rats exposés au E171 et préalablement traités avec de la DMH à 180 mg (kg pc)$^{-1}$. De même, les auteurs ne relèvent pas de différences chez	Le GT note que les auteurs indiquent une limitation méthodologique pour l'analyse des FCA réalisée seulement sur une partie de l'épithélium du colon en raison d'une autolyse liée à la fixation des tissus. Ces limitations méthodologiques entraînent une grande incertitude sur l'interprétation des résultats.

	les rats exposés uniquement au E171 et concluent à l'absence d'initiation et de promotion de lésions précancéreuses liées à l'exposition de rats au E171.	
Brandão *et al.* (2020)	Cet article décrit l'accumulation cellulaire et les dommages chromosomiques induits par un nanoTiO_2 (P25) sur quatre lignées cellulaires: A549 (cellule épithéliale alvéolaire humaine), HepG2 (hepatocyte humain), A172 (cellule gliale humaine) et SH-SY5Y (neurone humain). Après exposition pendant 3h ou 24h à 10, 50, 100 ou 200 µg/mL de P25, les effets sont mesurés à partir de la cytométrie en flux (FFC et SSC pour la détermination de l'accumulation cellulaire, extraction des noyaux et micronoyaux colorés à l'iodure de propidium dans le test du micronoyau). Les auteurs rapportent une accumulation cellulaire qui augmente avec la concentration de nano et avec le temps d'exposition. Ils ne détectent pas d'induction de micronoyaux, et ce quelle que soit la condition d'exposition.	Le GT note que les seuils de cytotoxicité imposés par les lignes directrices ne sont pas atteints et que les doses maximales testées ne sont pas justifiées.
Brown *et al.* (2019)	Cette étude met en œuvre le système ToxTracker pour détecter les dommages génotoxiques, ces résultats sont comparés à ceux obtenus dans le test des comètes (sur la lignée cellulaire HepG2 et Caco-2). ToxTracker donne des informations sur les mécanismes mis en jeu lors de l'apparition de dommages génotoxiques. Les cellules ont été exposées à des doses variant de 1,95 à 15.6 µg/cm² (6,25-50 µg/mL) de E171 pendant 4h, dispersés par sonication. Le système ToxTracker n'a pas été activé par l'exposition au E171, suggérant l'absence de réponse cellulaire à un stress génotoxique, et plus précisément l'absence d'interaction directe avec l'ADN et donc pas d'interférence avec sa réplication, pas de cassures double-brin de l'ADN, pas de réponse anti-oxydante de la cellule et pas de dommages chromosomiques. En revanche, dans le test des comètes, le E171 cause une augmentation du nombre de cassures et/ou de sites alkali-labiles mais pas du nombre de sites sensibles à la Fpg dans les cellules mES. Dans les cellules HepG2, ces deux types de dommages augmentent significativement, alors que dans les cellules Caco-2, une augmentation mineure des dommages à l'ADN est détectée. Ces dommages à l'ADN sont corrélés à une diminution du contenu cellulaire en glutathion.	Le GT note que les particules sont mises en suspension dans de l'eau supplémentée avec 2% de sérum de veau fœtal, suivi d'une sonication pendant 10 minutes. Les paramètres de sonication ne sont pas précisés. La sonication de particules dans un milieu contenant du sérum n'est pas approprié, ceci peut agglomérer les protéines et conduire à la production de métabolites réactifs qui peuvent entraîner des dommages cellulaires. De plus, le GT relève l'absence de justification pour la dose maximale testée.
Cao *et al.* (2020)	Etude réalisée chez la souris adulte présentant un phénotype obèse ou non obèse induit respectivement par un régime alimentaire riche ou faible en lipides. Les animaux sont exposés à du nanoTiO_2 (99% anatase et diamètre moyen 33nm) ou du E171 (44% de nano en nombre, diamètre moyen de 112nm, distribution en tailles 30-230nm) incorporés ou non (contrôles) aux mêmes régimes alimentaires à 0,1% en masse, pendant 8 semaines. Les auteurs n'ont rapporté aucune conséquence de l'exposition au TiO_2 (E171 ou formes nano) sur la prise de poids des souris ni sur les paramètres sanguins (bilirubine et protéines totales, taux de créatine phosphokinase et urée), excepté pour le régime nanoTiO_2 où une modification de production	Les études de transfert de flore souffrent d'une approche expérimentale ayant introduit un biais dans la conclusion quant au fait que le microbiote intestinal altéré était directement responsable de la plupart des observations (inflammation, dommages tissulaires). En effet, les données de concentration de titane dans les selles témoignent d'une très forte teneur résiduelle en particules de TiO_2 au moment du transfert de flore. Autrement dit, on ne peut exclure que les effets chez les souris receveuses soient plutôt le résultat de ces particules réintroduites avec les selles dans ce groupe d'animaux.

	des enzymes hépatiques (ratio ALT/AST) et du taux de phosphore circulant a été observée, en particulier chez les souris à phénotype obèse. Concernant le microbiote intestinal, les auteurs ont conclu à un impact délétère des particules de TiO_2 (E171 et nano) sur la composition bactérienne, avec des modifications proches de celles induites par un régime riche en graisse. Concernant l'activité métabolique du microbiote intestinal (production d'acide gras courte chaîne) chez la souris non obèse, une exposition au TiO_2 a été accompagnée d'une diminution de la production de butyrate et de valérate (E171 et nano), quand seul le E171 abaisse la production d'acétate et d'isovalérate. Concernant le risque inflammatoire dans le côlon de souris obèses ou non obèses, des altérations tissulaires ont été relevées après le seul traitement au nanoTiO_2. Une infiltration de cellules inflammatoires (cellules dendritiques et macrophages) a seulement été relevée chez les souris obèses exposées au nanoTiO_2. La teneur en cytokines dans les tissus a confirmé cette observation, une réponse inflammatoire étant rapportée après traitement au nanoTiO_2. Le nano TiO_2 altère le protéome hépatique et du côlon notamment chez les souris obèses. Enfin, les études de transfert de flore depuis les souris traitées au TiO_2 (nano ou E171) selon un régime obésogène, vers des receveuses saines (*i.e.,* non obèses), naïves de tout traitement TiO_2 et à microbiote « appauvri » par antibiothérapie ont conclu que seul le microbiote altéré de souris préalablement traitées au nanoTiO_2 induisait des dommages tissulaires au côlon.	
Cho *et al.* (2013)	Des rats ont été exposés à du nanoTiO_2 (26 nm, 80% anatase et 20% rutile) à des doses de 520, 1041 et 2083 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 14 jours. Cette étude n'a entraîné aucune modification des signes cliniques, hématologiques, biochimiques. Une étude à plus long terme (90 jours) a été mise en place avec des niveaux de doses de 260, 520 et 1041 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs rapportent la présence de titane dans le sang (effet dose réponse chez les mâles), aucun effet du nanoTiO_2 sur le poids du corps, l'absence d'augmentation significative de titane dans les organes et une excrétion majoritaire par les fèces.	Le GT note l'absence d'information relatives aux performances analytiques (ICPMS) pour le dosage du titane dans les tissus. Les résultats à la plus forte dose ne sont pas rapportés. Le nombre d'animaux testé pour chaque sexe n'est pas clairement précisé. Le GT estime surprenant de n'observer aucune augmentation de titane dans les organes alors qu'il est présent dans le sang.
Coméra *et al.* (2020)	Dans l'étude de Coméra 2020, des souris ont été exposées à une unique administration intra-gastrique de E171 (20 à 340 nm) à une dose de 40 mg (kg pc)$^{-1}$ par gavage. Les auteurs ont mis en évidence par microscopie confocale (et confirmé en microscopie électronique couplé à l'EDX pour les tissus intestinaux) une augmentation statistiquement significative de particules de TiO_2 dans les villosités et les plaques de Peyer du jéjunum (respectivement 4 et 8h après l'administration) ainsi que dans le sang (4 et 8h après l'administration). Cette augmentation n'est pas significative dans l'iléon et le colon. Les auteurs ont également mesuré une augmentation statistiquement significative de la quantité de titane (par ICP) dans les tissus	Le GT note que le % de nanoparticules constitutives de la fraction nanométrique du E171 n'est pas précis. Il note également une imprécision sur le nombre d'animaux traités par groupe.

	du jéjunum, de l'iléon et du colon. Malgré la présence de particules dans le sang, le niveau de titane reste inférieur aux limites de détection. La quantité de titane absorbée dans l'intestin dans le cadre de ce schéma expérimental reste très faible (0,007% de la quantité administrée). Les auteurs ne mesurent pas de modification de la perméabilité intestinale.	
Dekanski *et al.* (2018)	L'étude est réalisée sur des souris femelles (5 souris par groupe) selon la ligne directrice OCDE 420 mais certains éléments ne sont pas concordants avec les recommandations de cette ligne directrice. Les souris sont exposées à 2 doses de 1000 et 2000 mg (kg pc)$^{-1}$, réparties en 4 administrations à 30 min d'intervalle. Alors qu'il n'y a pas de mortalité à 1000 mg (kg pc)$^{-1}$, 2 des 5 souris sont mortes 1h après la dernière des 4 administrations avec la dose de 2000 mg (kg pc)$^{-1}$. A cette dose, il n'y a pas d'altération macroscopique visible sur les différents organes. Alors qu'à 2000 mg (kg pc)$^{-1}$ les animaux perdent du poids par rapport aux animaux contrôles les 4 premiers jours, l'effet inverse est observé à 1000 mg (kg pc)$^{-1}$. Des effets de somnolence apparaissent aux 2 doses accompagnés de léthargie à la plus forte dose. Les poids relatifs du foie sont augmentés à 14j pour les 2 doses. A 1000 mg (kg pc)$^{-1}$, 3 souris sur 5 présentent un foie élargi. Une altération de la fonction hépatique est observée avec l'augmentation des enzymes ALT et AST au niveau sérique. L'observation histologique des foies révèle dans le cytoplasme des hépatocytes des boursouflures au niveau des vacuoles, l'infiltration de cellules inflammatoires (leucocytes) et une dégénérescence hydropique (gonflement) avec dilatation de la veine centrale. Ces modifications indiquent que les TiO_2 peuvent altérer la perméabilité de la membrane des hépatocytes. D'après le test des comètes *in vivo*, aucune augmentation statistiquement significative de fragmentation de l'ADN sur cellules sanguines n'a été observée.	Le GT note un mode d'administration non conventionnel, seulement 2 doses testées, l'absence de preuve d'exposition des cellules et de mesure du % tail DNA pour le test des comètes.
Du *et al.* (2019)	Cette étude porte sur le potentiel mutagène d'un nanoTiO_2 de 40 nm évalué par le test de mutation inverse sur des bactéries (test d'Ames) et par le test du lymphome de souris (test MLA), avec et sans activation métabolique au S9. Ces tests, réalisés respectivement sur les lignées de salmonelle TA97a, TA98, TA100, TA102 et TA1535 (test d'Ames), et sur la lignée cellulaire de lymphome murin L5178Y, n'ont pas révélé de potentiel mutagène de ce nanoTiO_2 aux concentrations testées, allant de 31,2 µg/mL à 2 mg/mL dans le test MLA et de 78 à 1250 µg par plaque dans le test d'Ames pour des temps d'exposition de 2 et 24h.	Il est reconnu que le test d'Ames n'est pas adapté pour évaluer le potentiel mutagène des nanomatériaux car il se base sur des mesures sur bactéries n'ayant pas la capacité d'accumuler des substances par endocytose, or il est connu que l'endocytose est la voie d'accumulation principale des nanomatériaux. Le GT note : que les critères OCDE ne sont pas respectés, l'absence de preuve d'internalisation intracellulaire et un manque de rigueur dans la caractérisation du nanoTiO_2.
Ebrahimzadeh *et al.* (2017)	Cette étude complète deux précédentes études du même groupe (Mohammadipour 2013, 2014). Des rats femelles sont exposées par gavage à des nanoparticules de TiO_2 anatase de 10 nm, pendant et après la gestation à une dose de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. L'exposition a débuté au 2ème	Le GT note une caractérisation du nanoTiO_2 imprécise, des illustrations histologiques de faible qualité (fort bruit de fond, grandissement insuffisant) et l'absence d'information relative au passage et à l'accumulation de titane dans le tissu cérébral des mères et des nouveaux nés.

	jour post-coït et a été poursuivi jusqu'à la fin de la gestation (n=6 femelles). Dans un second groupe de rates allaitantes (n=6), le traitement a débuté au deuxième jour après la naissance et s'est poursuivi jusqu'au sevrage de la descendance (jour 21 post-natal). Selon les auteurs, l'exposition *in utero* des nouveau-nés par les mères exposées pendant la période de gestation a conduit : à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans l'hippocampe des rats mâles âgés de 1 jour, à une diminution du nombre de neurones granulaires immatures dans les champs ammoniens (mais pas dans le gyrus denté) ainsi qu'une modulation de l'expression de gènes (Bax et Bcl2) impliqués dans le contrôle de l'apoptose. L'exposition indirecte des nouveau-nés par le lait maternel a conduit : à l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans l'hippocampe des mâles de 22 jours, à une diminution du nombre de neurones granulaires immatures dans le gyrus denté ainsi qu'à une modulation de l'expression de gènes (Bax et Bcl2) impliqués dans le contrôle de l'apoptose au niveau de l'hippocampe.	
Farrell *et al.* (2017)	Des rats ont été exposés à 4 formes de TiO_2 (3 rutiles et 1 anatase) dont la taille varie de 20 à 200 nm pendant 7 jours consécutifs, suivis d'un laps de temps (1h, 24h et 72h) en nourriture contrôle. Les concentrations de TiO_2 dans la nourriture varient de 198 à 207 mg/kg de poids humide. Les rats consommant environ 24 à 30 g de nourriture par jour, leur dose quotidienne de TiO_2 était donc de 24 à 30 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les concentrations de titane dans le foie, les reins et les muscles (analysées par ICP-AES) ont été trouvées principalement inférieures à la limite de détection (<0,1 à < 0,2 mg/kg poids humide) ; les concentrations tissulaires de titane au-dessus de la limite de détection étaient comprises entre 0,1 et 0,3 mg/kg de poids humide pour tous les groupes. Les concentrations de titane dans le sang total étaient <0,04 mg/L pour tous les groupes. L'excrétion urinaire de titane était équivalente à moins de 2 % de la dose quotidienne par litre d'urine pour tous les groupes et était généralement inférieure à la limite de quantification (<0,04 mg/L). Selon les auteurs, les matières fécales représentent la principale voie d'excrétion et il n'y a pas d'accumulation de titane dans les tissus suite à la consommation de TiO_2 de qualité alimentaire.	Le GT note que le lot de TiO_2 utilisé pour la caractérisation de la taille des particules était différent de celui qui a été utilisé pour le traitement des animaux. De plus, les mesures dans les fèces ne sont pas rapportées avant le 10ème jour.
Fresegna *et al.* (2021)	Dans cette étude, 2 modèles cellulaires pulmonaires A549 et BEAS-2B 2 ont été exposées à 2 types de nanoTiO_2 de 44 nm (anatase) et 77 nm (rutile) pendant 2h ou 2 h à des doses variant de 1 à 40 µg/mL. Les nanoTiO_2 de 44 nm entraînent une augmentation de la fragmentation uniquement dans les cellules A549 après 2h d'exposition alors que les nanoTiO_2 de 77 nm entrainent une augmentation de la fragmentation dans les 2 lignées cellulaires à 2 et 24h. Les dommages oxydatifs sont observés pour les 2 types de TiO_2 uniquement dans les cellules A549 à 2 et 24h.	Dans l'étude de génotoxicité (test des comètes), les auteurs présentent des résultats normalisés (%Tail DNA). Du fait de la variabilité des résultats observée dans cette étude, il aurait été opportun d'indiquer les valeurs brutes et non des valeurs normalisées afin de détecter d'éventuels biais (niveau de %Tail DNA déjà fort dans les contrôles de certaines conditions, variabilité des contrôles). Ces irrégularités dans la formulation des résultats limitent leur interprétation.

Gao *et al.* (2020)	Des rats adultes sont exposés pendant 30 jours par gavage gastrique quotidien à une suspension de TiO_2 de taille micro (M-TiO_2, 120±30nm) ou nanoparticulaire (N-TiO_2, 24±5 nm), préalablement soniquée puis homogénéisée par vortex avant chaque utilisation. Trois doses à 2, 10 et 50 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$ ont été testées, les animaux contrôles ayant reçu le véhicule seul (eau ultrapure). Les deux conditions de traitement (M-TiO_2 et N-TiO_2) n'ont eu aucune incidence sur la prise alimentaire et le poids corporel des animaux quelle que soit la dose administrée. Pour chaque dose, les auteurs ont répertorié des atteintes histologiques (diminution des villosités, perte de cryptes intestinales, infiltration neutrophilaire) plus importantes dans le groupe traité aux N-TiO_2, mais aucunes données statistiques ne viennent appuyer ces observations. De même, quelques altérations ultrastructurales ont été relevées, essentiellement des microvillosités plus éparses et moins hautes en comparaison des contrôles et indépendamment de la taille des particules de TiO_2. Une élévation significative du niveau circulant de Ti a été relevée dans les seuls groupes traités aux N-TiO_2, à partir de 10 mg $(kg\ pc)^{-1}\ j^{-1}$. En conditions basales (*i.e.,* avant ajout de nutriments dans les anses intestinales), des modifications de la concentration sanguine en acides aminés ont été observées, alors que les niveaux circulants de glucose et de métaux restaient stables par rapport au groupe contrôle. Deux heures après addition de nutriments en mélange dans les anses intestinales, les auteurs ont conclu à une diminution de l'absorption en acides aminés ajoutés (aucun effet sur celle du glucose et des métaux), essentiellement de la thréonine et l'histidine. Ces effets n'ont toutefois été observés que dans le groupe traité aux N-TiO_2 à la plus faible dose $(2\ mg\ (kg\ pc)^{-1}\ j^{-1})$.	Le GT note l'absence de précisions relatives aux performances analytiques, l'absence d'EDX lors des observations des tissus en microscopie électronique et des données statistiques peu robustes.
García-Rodríguez *et al.* (2018)	Dans cette étude, menée sur une co-culture de cellules Caco-2 et HT29 (proportion 90/10) différenciées, les auteurs montrent que des nanosphères (< 25 nm), nanobâtonnets (100x250 nm) et nanofils (100x10 nm) de TiO_2 dispersés selon le protocole standard du projet Nanogenotox provoquent des dommages génotoxiques. Grâce au test des comètes, les auteurs montrent que ces 3 types de TiO_2 induisent des cassures de l'ADN et/ou des sites alkali-labiles après 24h d'exposition à des concentrations allant de 12,5 à 350 µg/mL, qui subsistent après 48h d'exposition dans le cas des nano-bâtonnets et à la plus forte concentration de nano-sphères. Ces dommages sont corrélés avec la biopersistence des TiO_2 dans les cellules, les nano-bâtonnets persistant plus longtemps que les autres formes de TiO_2. Le test des comètes modifié par l'ajout de Fpg montre une diminution du nombre de sites sensibles à la Fpg, dont fait partie la base oxydée 8-oxo-dGuo, après exposition pendant 24h à 150 ou 350 µg/mL aux nano-sphères et nano-bâtonnets, et à 50 et 150 µg/mL de nano-fils de TiO_2. De plus, en utilisant la microscopie confocale, les auteurs montrent que ces 3 formes de TiO_2 se	Le GT note une incohérence des résultats (diminution de fragmentation pour certaines concentrations) et l'absence d'une augmentation de la fragmentation dose-reliée. De plus, lorsqu'il est question de reproduire ce type d'épithélium *in vitro*, la lignée généralement utilisée est la lignée HT29-MTX et non la lignée HT29, car les cellules HT29 ne secrètent pas une quantité importante de mucus.

	localisent dans le noyau cellulaire, pouvant donc entrer en contact avec l'ADN.	
Gea *et al.* (2019)	Cette étude s'attache à évaluer l'influence de la morphologie de nanoTiO_2 anatases sur les effets cyto- et génotoxiques, sur les cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B, en présence ou en absence de lumière. A partir de nano-bipyramides, des nano-bâtonnets et des nano-plaquettes de TiO_2 ainsi que du P25 et du E171, les effets cyto- et génotoxiques sont évalués lorsque les cellules sont exposées à 20-160 µg/mL de TiO_2 pendant 24h à l'obscurité ou pendant 1h à la lumière ambiante puis 23h à l'obscurité. Les auteurs ne montrent pas de diminution majeure de la survie cellulaire après exposition aux nanoTiO_2, ni à la lumière ni dans l'obscurité. Les effets génotoxiques sont évalués par le test des comètes, dans sa version alcaline et dans sa version modifiée par l'emploi de Fpg. Lors d'exposition à la lumière, les bipyramides et les nano-bâtonnets de TiO_2 n'induisent pas de dommages génotoxiques. En revanche, le P25 entraîne une augmentation du nombre de sites sensibles à la Fpg, et le E171 et les nano-plaquettes de TiO_2 causent une augmentation à la fois du nombre de cassures de l'ADN et/ou sites alkali-labiles et du nombre de sites sensibles à la Fpg. Ces augmentations sont dépendantes de la concentration de TiO_2 à laquelle les cellules sont exposées, et sont significatives dès la concentration de 50 µg/mL pour les P25 et E171, et à 80 µg/mL pour les nano-plaquettes de TiO_2. L'intensité des dommages est plus forte dans les cellules exposées au E171 que dans les cellules exposées aux autres nanoTiO_2. Ces dommages sont également présents, mais dans une moindre mesure, lors d'expositions à l'obscurité. Ces dommages sont corrélés à la présence de TiO_2 dans les cellules, qui n'ont pas pu être détectés dans le cas des bipyramides et des nano-bâtonnets.	Le GT note : l'absence d'information sur le nombre de cellules analysées, des tests de cytotoxicité incomplets et l'absence de justification pour la dose maximale testée.
Geraets *et al.* (2014)	La distribution tissulaire et la cinétique sanguine de diverses nano TiO_2 (NM-100, NM-101 et NM-102 pour l'anatase, NM-103 et NM-104 pour le rutile), qui diffèrent par la taille des particules primaires, la forme cristalline et l'hydrophobicité, ont été étudiées chez le rat jusqu'à 90 jours après l'exposition, après l'administration intraveineuse ou par gavage. Les doses orales de 7-9 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (mâles) et 11-12 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} (femelles) sont administrée en dose unique ou répétée pendant 5 jours. Les organes sont collectées 24h après la dernière administration. Concernant les expositions en intraveineuse, les rats reçoivent une injection unique ou répétée durant 5 jours consécutifs de doses journalière de 8.4-9.8 (kg pc)$^{-1}$ pour les mâles et de 12.4-14.1 mg (kg pc)$^{-1}$ pour les femelles. La majorité des résultats indiquent pour la voie orale une concentration en titane inférieure à la LOD dans la rate et le foie. Seuls 2 animaux présentent un taux de titane supérieur à la LOD dans le foie et 1 seul animal pour la rate. Du titane a également été détecté dans les ganglions lymphatiques	

	mésentériques avec le NM-104. Les auteurs concluent à la très faible absorption du nanoTiO$_2$ par voie orale. Les administrations en intraveineuse indiquent qu'après l'exposition systémique, le nanoTiO$_2$ est principalement distribué au niveau du foie, de la rate et des poumons et son élimination est très lente. Une redistribution est observée entre la rate et le foie sur une période de 90 jours après l'exposition.	
Grissa *et al.* (2015)	Des rats mâles ont été exposés par gavage pendant 60 jours aux doses de 50, 100 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} de nanoTiO$_2$ (5-12 nm). Un groupe témoin négatif (eau distillée) a été ajouté. 24h après la dernière administration, les rats ont été pesés, anesthésiés et des échantillons de sang ont été prélevés par ponction cardiaque pour les paramètres hématologiques, les frottis sanguins et le test des comètes. Les rats ont ensuite été euthanasiés et un fémur de chaque rat a été prélevé pour la préparation des frottis de moelle osseuse (test du micronoyau). Les auteurs observent une augmentation statistiquement significative de la fréquence des micronoyaux dans les cellules de la moelle osseuse et une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN au niveau des leucocytes du sang circulant. D'après les frottis sanguins, les nanoTiO$_2$ ont produit des globules rouges hypochromatiques poïkilocytotiques (de forme anormale), contenant parfois des fragments de micronoyaux ou des corps de Heinz, présents dans environ 60 % des globules rouges des rats traités avec 200 mg (kg pc)$^{-1}$. Les lymphocytes et les neutrophiles des rats traités avec des groupes de 100 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ de nanoTiO$_2$ avaient également des noyaux de forme anormale et hyper segmentés.	Le GT note l'absence de données permettant d'exclure un effet cytotoxique pour le test des comètes. Pour le test du micronoyau, le GT note l'absence de témoin positif et une fréquence de micronoyau très élevée (interférence possible des granules de mastocytes).
Grissa *et al.* (2016)	Des rats ont été gavés pendant 60 jours à des doses de 50, 100 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} de nanoTiO$_2$ dont la taille est comprise entre 5 et 10 nm. Les auteurs ont constaté chez les rats exposés, un ratio poids du cerveau sur poids du corps entier diminué selon une modalité dose dépendante, accompagnée d'une baisse de l'expression de l'acétylcholinestérase à partir de la dose de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ et d'une surexpression d'IL6 pour la dose maximale de 200 mg (kg pc)$^{-1}$. Les auteurs rapportent de la même manière une augmentation de cellules exprimant la GFAP dans le cortex des rats à partir de 100mg (kg pc)$^{-1}$.	Le manque de précision sur les modalités de prélèvement du cerveau fait qu'il n'est pas possible de s'assurer que l'effet observé sur le poids n'est pas en lien avec le biais toujours possible de la non reproductibilité du prélèvement (comme par exemple la précision du site choisi pour la section arrière du cerveau, à quel niveau du tronc cérébral se placent les expérimentateurs, selon quels repères ?). Le GT note également un manque de précisions relatives au nombre d'animaux traités, au nombre de répétitions analytiques et des propositions mécanistiques peu convaincantes.
Grissa *et al.* (2017)	Des rats sont exposés à une dose de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} à du nanoTiO$_2$ (5-12 nm) pendant 60 jours. Les auteurs relèvent une diminution du gain de poids corporel, l'augmentation du taux d'IL-6, de glucose, du cholestérol et des triglycérides ainsi qu'une modulation de marqueurs du stress oxydant (catalase, superoxyde dismutase). Le test des comètes mené sur des leucocytes du sang circulant issus du groupe exposé au TiO$_2$ révèle une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN par rapport au groupe contrôle.	Le GT note qu'une dose unique a été considérée dans le schéma de traitement des animaux.

Grissa *et al.* (2020)	Des rats ont été gavés pendant 60 jours à des doses de 50, 100 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} de nanoTiO_2 dont la taille est comprise entre 5 et 10 nm. Les analyses histologiques révèlent la présence de souffrances neuronales, de foyers de cellules gliales et de cellules inflammatoires activées dans le cortex frontal. L'application de la méthode TUNEL suggère des cellules entrées en mort par apoptose, uniquement pour la dose maximale de 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs indiquent une baisse de l'expression des enzymes antioxydantes notamment aux doses 100 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} ainsi qu'une augmentation des niveaux des marqueurs d'inflammation, le TNF-α étant significativement plus élevé uniquement pour la dose maximale de 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}.	Le GT note l'absence de quantification (scoring) en histologie et l'absence de coloration histologique spécifique.
Heo *et al.* (2020)	Des rats (15 par sexe et par groupe) ont été exposés par gavage à du nanoTiO_2 (P25, 21 nm) à des doses de 250, 500 et 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 90 jours. Une période de récupération de 28 jours est mise en place 24h après le dernier traitement afin de vérifier la persistance des potentiels effets néfastes en l'absence de traitement. Cette étude n'a mis en évidence aucun effet toxicologique systémique spécifique associé au P25. La substance n'a pas été détectée dans les organes cibles. Des variations de paramètres en lien avec l'hématologie, la biochimie sérique et l'histopathologie ont néanmoins été relevées, mais elles n'ont pas été attribuées au traitement par le nanoTiO_2 (altération intermittente, pas de relation dose-effet, effet réversible, lésions histologiques isolées et spontanées chez les témoins). La même étude menée sur une période de 28 jours n'a pas mis en évidence d'effets toxicologiques liés au traitement par le nanoTiO_2. Une NOAEL orale de 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} a été identifiée chez le rat pour le nanoTiO_2 P25.	
Hong *et al.* (2014)	Des souris ont été gavées à des doses de 2,5, 5 et 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant six mois avec du nanoTiO_2 anatase de 5-6 nm. Les auteurs indiquent une accumulation de titane dans le foie, une réduction de la masse corporelle, l'apoptose d'hépatocytes, des variations de l'expression de gènes impliqués dans des processus immunitaires ainsi que des modulations des teneurs en interleukines qui reflèteraient une inflammation hépatique. Les auteurs concluent que l'altération de l'expression du facteur Th2 (IL4 et 5) peut être impliquée dans le contrôle de l'inflammation hépatique induite par la toxicité chronique du nanoTiO_2.	Le GT note une incohérence concernant le nombre d'animaux traités pour les différents groupes de doses.
Hong *et al.* (2017)	Des souris femelles gestantes ont été exposées par gavage gastrique pendant 17 jours (de G0 au bouchon vaginal, à G17) à des nanoparticules de TiO_2 (forme anatase, taille nominale 6,5 nm) non soniquées et mises en suspension dans un milieu HPMC (hydroxypropyl methylcellulose). Les doses de traitement étaient de 0 (contrôles HPMC seul), 25, 50 et 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}, administré à des groupes de 5 souris par dose. A G15 de	Le GT note l'absence de quantification (scoring) des atteintes histologiques.

	gestation, le poids corporel des mères est significativement diminué à la plus forte dose de 100mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}, et à toutes les doses à G18 au moment du sacrifice. A ce stade, la concentration sérique en Ti chez les mères et le taux de Ti dans les placenta et fœtus viables sont augmentés de façon dose-dépendante par rapport aux contrôles. A l'inverse, les niveaux de calcium et de zinc dans le sang maternel, les placenta et fœtus ont diminués en fonction de la dose, les différences étant toutes significatives pour le calcium et le zinc à partir de 50 mg de TiO_2 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} donné aux mères (excepté pour le calcium placentaire, dès 25 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}). Le taux de mortalité fœtale a été augmenté de 60% dès la dose de 50 mg de TiO_2 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}, un effet corrélé au nombre élevé de sites de résorption placentaire par rapport aux contrôles. Une diminution significative du poids des placentas et des fœtus viables, ainsi que de leur taille (largeur et longueur), a été observée à la plus forte dose. Enfin, l'évaluation des atteintes anatomo-morphologiques sur le squelette fœtal à la plus forte dose de traitement TiO_2 a révélé des altérations du développement, en particulier une baisse du niveau d'ossification et de cartilage accompagnée de diverses atteintes du crâne, des maxillaires, du sternum et des membres. Selon les auteurs, la restriction de croissance intra-utérine des fœtus résulterait du défaut de croissance placentaire en réponse au traitement TiO_2 (accumulation locale de titane), affectant les fonctions d'échanges materno-foetaux et responsable d'un développement fœtal anormal et de résorptions d'unités foeto-placentaires.	
Hong *et al.* (2018)	Des souris femelles adultes ont été exposées à des nanoparticules de TiO_2 (anatase, 5-6 nm) préalablement soniquées dans un milieu HPMC (hydroxypropyl methylcellulose). Les doses de traitement étaient de 2,5 ; 5 et 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}, administrées par gavage gastrique à des groupes de 50 souris par dose. Une analyse histopathologique a révélé un nombre plus élevé de follicules atrétiques dès 2,5 mg de TiO_2 (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} par rapport aux témoins, accompagné d'une infiltration neutrophilaire synonyme d'inflammation à la dose la plus forte (10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}). Les niveaux sériques de FSH, LH, AMH, PRL, TSH, T3 et T4 ont été significativement augmentés, concomitants à une chute dose-dépendante des concentrations d'inhibine B, d'œstradiol et de progestérone. Le rapport FSH/LH a augmenté significativement de façon dose-dépendante, résultat corrélé négativement aux taux de fertilité chez ces souris (chute de 15 à 40% des gestations). En parallèle, les auteurs ont rapporté une augmentation importante des marqueurs d'auto-immunité, en particulier une forte élévation d'anticorps TPO.	Le GT note que les femelles ont été sacrifiées sans indication de leur stade de cycle œstral (phase folliculaire versus phase lutéale), un facteur susceptible de s'accompagner d'une forte variabilité dans les résultats des dosages d'hormones, en particulier l'estradiol, la progestérone, l'inhibine B, la LH et la FSH.
Hu *et al.* (2015)	Des souris ont été exposées à des doses de 64 et 320 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} de P25 par gavage durant 14 jours. Les auteurs observent une augmentation du taux de glucose dans le sang et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le sang et le foie. Les auteurs n'observent pas de modification	Le GT note que le mode d'administration et le nombre d'animaux testés ne sont pas précisés.

	du taux d'insuline ni d'apoptose au niveau des cellules β du pancréas. Selon les auteurs, la production de ROS entrainerait une résistance à l'insuline et une augmentation du taux de glucose.	
Hu *et al.* (2016)	Des souris ont été gavés durant 18 semaines à du P25 par gavage à une dose de 64 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les résultats observés sont identiques à ceux de Hu 2015.	
Hu *et al.* (2018)	Des souris ont été gavés durant 6 mois à du P25 par gavage à des doses de 10, 20, 50, 100 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs ont observé une augmentation du taux de glucose dans le sang à partir de la semaine 8 à 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} ainsi qu'une augmentation des marqueurs de l'inflammation (IL6 et TNFalpha) et un stress oxydant au niveau du réticulum endoplasmique. Les auteurs ne relèvent pas de modifications des taux d'insuline et de lipides dans le sang ni d'apoptose au niveau du pancréas. Les auteurs étayent le mécanisme proposé dans Hu 2015 : la production de ROS liée à un stress du réticulum endoplasmique au niveau du foie entraînerait une résistance à l'insuline provoquant ainsi une augmentation du taux de glucose.	Le GT note l'absence de quantification sur les données histologiques et que les résultats pour l'ensemble des doses testées ne sont pas rapportés dans l'article ainsi que
Hu *et al.* (2019)	Des souris ont été exposées à du P25 par gavage pendant 6 mois à une dose de 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs observent une augmentation du taux de glucose dans le sang à partir de la 8ème semaine chez les jeunes et de la 26ème semaine chez les adultes. Absence d'apoptose des cellules β du pancréas et pas de modification du taux d'insuline. Les mécanismes proposés sont identiques à ceux de Hu 2018.	Le GT note qu'une seule dose est administrée dans le schéma de traitement des animaux.
Janer *et al.* (2014)	Des rats mâles (6 par groupe) ont été exposés à du nanoTiO_2 de 18 nm ± 8 nm (anatase) par gavage à une dose unique de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} en une seule administration. Les rats sont sacrifiés 24h après l'administration et la rate, le foie, et les intestins ont été prélevés. Aucune augmentation statistiquement significative du niveau de titane n'a été mesurée par ICPMS dans aucun des tissus prélevés. Aucune particule de TiO_2 n'a été trouvée dans les sections lisses du petit intestin examinées par TEM. Les auteurs ont observé au moins une cellule contenant de nombreux agrégats de particule de nanoTiO_2 dans une plaque de Peyer. Dans cette cellule, les particules n'étaient pas entourées de membranes, mais librement distribuées dans le cytoplasme. Cela suggère qu'un seul gros agrégat a pu être endocyté par cette cellule.	Le GT note que les animaux ont reçu une unique administration de nanoTiO_2 à une à une dose unique élevée. Ce schéma de traitement est peu informatif d'une exposition répétée.
Jensen *et al.* (2018)	Les auteurs ont exploré les effets sur le système cardiovasculaire 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 pc)$^{-1}$). 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 oxydant. Le E171 (à des doses de 500 mg (kg pc)$^{-1}$) 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 oxydant (ascorbate, malondialdéhyde, tétra hydrobioptérine marqueur de l'activation de la voie eNOS et diméthylarginine) n'a été observée entre les groupes témoins et traités.	
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 les effets génotoxiques chez le rat à des doses de 50 et 500 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} par gavage une fois par semaine pendant 10 semaines. Les rats ont été sacrifiés 24h 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 : Fpg et 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. 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.	Le GT relève plusieurs limitations : absence de témoin positif, administration sur 10 semaines mais seulement 1fois par semaine permettant la réparation d'éventuels dommages, seulement 2 doses testées, la dose maximale testée n'est pas justifiée, pas de preuve d'exposition des cellules, le prélèvement des organes est effectué 24h après la dernière administration au lieu des 2 à 6h recommandés. Enfin, 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.
Kazimirova *et al.* (2019)	Cet article rapporte les effets génotoxiques du P25, dispersé selon trois protocoles différents, sur des modèles cellulaires variés qui ont été exposés *in vitro* ou *ex vivo* (lignée cellulaire TK6 (lymphoblastoïde, humain), lymphocytes de volontaires humains, cellules mononucléées de sang périphériques (PBMC) humains), ou issus de rats exposés par injection intraveineuse au TiO_2 (érythrocytes de moelle osseuse et PBMC, récoltés 1 jour, 1 semaine, 2 semaines ou 4 semaines après injection). Pour les expériences *in vitro* et *ex vivo*, les concentrations employées sont de 3, 15 et 75 µg/cm² ; pour l'injection intraveineuse la dose est de 0,59 mg (kg pc)$^{-1}$. Les effets génotoxiques sont évalués via le test des comètes (alcalin et Fpg) et le test du micronoyau. Un effet significatif est observé uniquement sur les PBMC humains et de rat et dépend du protocole de dispersion. Ainsi, lorsque le nanoTiO_2 est dispersé de façon à ce qu'une suspension peu agglomérée soit obtenue (sonication 15 min à 100W dans du PBS), le nanoTiO_2 provoque	Le GT note que les critères OCDE ne sont pas respectés. De plus, le GT note l'absence de preuve d'internalisation intracellulaire, l'absence de test de cytotoxicité et l'absence de justification pour la dose maximale testée.

	une augmentation significative du niveau de cassures dans les PBMC humains à 15 et 75 µg/cm². A contrario, lorsque le P25 est aggloméré (dispersion dans du milieu de culture sans sérum par sonication durant 3 min à 60W), elles ne causent pas d'augmentation du niveau de dommages dans le test des comètes. Le test du micronoyau reste négatif, en moyenne, quelle que soit la condition testée (condition de dispersion, concentration, modèle). Néanmoins, une augmentation significative des micronoyaux est observée chez certains des donneurs, suggérant une susceptibilité individuelle particulière de ces individus. Chez les rats exposés par injection intraveineuse, une augmentation significative du niveau de cassures est observée 1 jour après l'injection, mais pas aux temps de prélèvement suivants.	
Kazimirova *et al.* (2020)	Cette étude rapporte la recherche d'un effet mutagène du P25 (NM105, 21 nm) sur la lignée cellulaire V79-4 (hamster chinois) selon la ligne de conduite OCDE TG 476, le P25 ayant été dispersé selon deux protocoles différents, donnant lieu à une suspension stable et peu agglomérée ou une suspension très agglomérée. Les auteurs ne rapportent pas d'effet mutagène dans les conditions testées (3, 15 et 75 µg/cm², exposition pendant 24h) et ce malgré une accumulation cellulaire significative, démontrée par TEM après exposition des cellules pendant 24h à 3, 10 ou 30 µg/cm² de P25. Ces expositions n'entraînent pas non plus d'effet significatif sur la croissance cellulaire (bleu trypan) et sur l'efficacité de clonage (plating efficiency).	Le GT note que les concentrations maximales ne sont pas justifiées et que les seuils de cytotoxicité ne sont pas atteints.
Kreyling *et al.* (2017)	Cette étude s'est intéressée à la toxicocinétique de particules de TiO_2 (< 50 nm) radiomarquées avec du vanadium chez des rats femelles après une unique administration (gavage) à des doses comprises entre 30 et 80 µg (kg pc)$^{-1}$. Cette technique de radiomarquage permet de localiser précisément le devenir *in vivo* des particules de TiO_2 dans les tissus avec une grande sensibilité. La majorité des particules de TiO_2 sont directement excrétées dans les selles après gavage. Seule une fraction de 0,6 % de la dose appliquée traverse la barrière intestinale après 1h et diminue au fil du temps jusqu'à 0,05 % à 7 jours. Les fractions de particules retrouvées dans les organes après 7 jours sont de 3.25% dans le foie (0,09 ng·g^{-1}), 2,30% dans les poumons (0,10 ng·g^{-1}), 4,11% dans les reins (0,29 ng·g^{-1}), 5.52% dans le cerveau (0,36 ng·g^{-1}), 0,99% dans la rate (0,45 ng·g^{-1}), 8,16% dans l'utérus (0,55 ng·g^{-1}) et 32,4% dans le squelette (0,98 ng·g^{-1}). Sept jours après l'application orale, la plupart des organes conservent encore une fraction supérieure à 0,001 % de la dose appliquée, ce qui correspond à environ 107-108 nanoparticules. En comparant la biodistribution des nanoparticules de TiO_2 retenues après le passage à travers la barrière gastro-intestinale avec la biodistribution déterminée après injection intraveineuse dans la première partie de cette étude, les schémas biocinétiques sont très différents. Ainsi, l'injection intraveineuse ne semble	Cette étude est considérée par le GT comme une étude de référence, le marquage radioactif permet d'améliorer la spécificité et la sensibilité de l'analyse.

	pas être un substitut adéquat pour évaluer la biodistribution et les effets potentiels sur la santé qui se produisent après une exposition orale aux nanoparticules de TiO_2.	
Lee *et al.* (2019)	Dans cette étude, des rats femelles ont été exposées par gavage à du nanoTiO_2 (21 nm anatase (80) /rutile (20)) au cours de leur gestation (du jour 6 à 19) à des doses de 100, 300 et 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Cette étude a été menée selon la ligne directrice OCDE 414 et les bonnes pratiques de laboratoire. Les auteurs rapportent une augmentation de la teneur en titane dans le foie, le cerveau et le placenta des mères à la plus forte dose. Aucun effet ni aucune modification n'ont été observés concernant les paramètres suivants : le poids des organes, les corps jaunes, l'examen macroscopique du placenta, l'implantation, la mortalité fœtale, le poids des fœtus, l'examen externe et interne des fœtus. Dans le cadre de cette étude, une NOAEL de 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} est proposée par les auteurs.	Le GT note : l'absence de paramètres demandés dans les lignes directrices (histologie de la thyroïde, distance anogénitale, cryptorchidie), que l'étude est menée avec seulement 12 femelles (au lieu de 20 demandées) et que la caractérisation du nanoTiO_2 est incomplète.
Martins *et al.* (2017)	Des rats mâles sont exposés par gavage à du nanoTiO_2 (42 nm) pendant 45 jours à une dose de 0,5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Dans le groupe exposé au nanoTiO_2, les niveaux de Ti se sont révélés plus élevés dans les reins (3 µg/g de tissu) par rapport au sang et au foie (2 µg/g). Concernant le test des comètes, aucune augmentation significative du % d'ADN dans la queue par rapport au contrôle négatif n'a été observé dans les deux tissus investigués (foie et sang périphérique).	Le GT note : l'absence de contrôle positif, que le temps de prélèvement n'est pas précisé, que la dose maximale testée est faible et non justifiée.
Modrzynska *et al.* (2018)	Des rats ont été exposés par gavage (1 administration) à une dose de 9 mg (kg pc)$^{-1}$ de nanoTiO_2 (10,5 nm rutile). Les animaux sont sacrifiés après 1, 28 et 180 jours. Aucune mortalité ni aucun changement sur le comportement des animaux n'est rapporté. Aucune particule de TiO_2 n'est détectée dans le foie (ni par microscopie électronique ni par ICP).	Le GT note que cette étude est principalement destinée à étudier la toxicocinétique des particules de TiO_2 après exposition par inhalation. Compte tenu de la faible dose et d'une administration unique, l'absence de détection dans le foie est pertinente étant donné la faible absorption intestinale attendue pour ce type de nanomatériau. De plus, les performances analytiques (LOQ et recovery) ne sont pas fournies.
Mohamed (2015)	Des souris mâles adultes (15 animaux /groupe) ont été exposées par gavage pendant 5 jours aux doses de 5, 50 ou 500 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}de nanoTiO_2 (46 nm, rutile (77%) / anatase (23%)). D'après les auteurs, après administration orale aux 3 doses testées pendant 5 jours, le nanoTiO_2 a été retrouvé dans l'estomac jusqu'à 2 semaines après l'arrêt de son administration, et a entraîné le développement d'une gastrite, comme le montrent les résultats de l'apoptose, les changements histopathologiques (nécrose et inflammation) et l'induction d'un stress oxydatif dans les cellules gastriques des souris traitées. Une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN a été notée chez les animaux traités par voie orale à 5, 50 et 500 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}par rapport au contrôle négatif. De plus, d'après les auteurs, cette étude révèle que l'apoptose induite par le nanoTiO_2 est médié par p53.	Le GT note que les analyses montrent de la nécrose (histologie) et de l'apoptose (ADN en échelle). Il apparait alors impossible de distinguer si les effets sont d'origine cytotoxique, inflammatoire ou génotoxique.
Mohammadipour *et al.* (2013)	Des rates ont été exposées par gavage à du nanoTiO_2 (10 nm, anatase) à une dose de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} au second jour après la mise bas jusqu'au	Le GT note : que le nombre d'animaux traités n'est pas précisés, l'absence d'examens histologiques, l'usage d'une dose unique et l'absence d'information

	sevrage des ratons (21ème jour post natal). Chez les ratons, une augmentation significative de la latence et des distances de nage pour atteindre le plateau de repos placé dans l'un des quarts de surface de la piscine a été observée. Ces effets se sont estompés au-delà de trois jours sur les cinq de tests quotidiens. Une observation équivalente a été obtenue dans le test d'évitement passif, les ratons ne mémorisant pas le stimulus de peur subit préalablement. Ce comportement a été maintenu 48h après avoir reçu le choc électrique initial.	relative au passage et à l'accumulation de titane dans le tissu cérébral des mères et des nouveaux nés.
Mohammadipour *et al.* (2014)	Dans cette étude, des rates ont été exposées par gavage à du nanoTiO_2 (10 nm, anatase) à une dose de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Le traitement a débuté au 2ème jour de gestation jusqu'au terme (21ème jour). A la naissance, une accumulation de Ti (160 ng/g de tissu) a été observée essentiellement dans les cerveaux des ratons exposés au TiO_2 au cours de la gestation, accompagné d'une élévation significative du poids de cerveau (estimé à 10%), un effet montré associé à une augmentation du poids corporel. Toujours à la naissance, les auteurs ont montré une chute significative du niveau de prolifération cellulaire par unité de surface dans l'hippocampe des rats exposés *in utero* au TiO_2 d'origine maternelle. Pour les tests de comportement dans la descendance adulte, les mêmes conclusions que dans l'étude de 2013 (exposition pendant la lactation) ont été obtenues, toutefois à un degré considérablement moindre en termes d'amplitude d'effet.	Le GT note : des tests effectués uniquement chez les mâles, des mesures de prolifération peu conventionnelles et l'absence d'information relative au passage et à l'accumulation de titane dans le tissu cérébral des mères et des nouveaux nés.
Mohammed *et al.* (2020)	Des rats ont été exposés par gavage à une dose de nanoTiO_2 (63–142 nm) de 500 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}pendant 14 jours. Les auteurs ont observé une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation pro-inflammatoire, une dégradation des hépatocytes et l'apparition d'un grand nombre de cellules de Kupffer, des modulations de différents paramètres sériques pouvant traduire une altération hépatique, des modulations de biomarqueurs et de l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant	Le GT a identifié plusieurs limitations dans ces études notamment l'absence d'approche quantitative pour les études histologiques ainsi que des schémas de traitement proposant une seule dose.
Moradi *et al.* (2019)	Dans cette étude, des rats ont été gavés avec du nanoTiO_2 (20 nm, anatase 80% / rutile 20%) pendant 14 jours à une dose de 300 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. L'observation histologique des foies révèle la dilatation de la veine porte et l'hypertrophie des cellules de Kupffer. De plus, une dégénération vacuolaire et hydropique des hépatocytes allant jusqu'à l'œdème et la nécrose autour de la veine centrale dilatée et l'infiltration de cellules inflammatoires sont rapportées. L'augmentation de marqueurs sériques (ALT, AST, ALP et LDH) souligne l'altération de la fonction hépatique. Un effet stress oxydant est également observé avec la diminution de TAC et des activités GPx, SOD et catalase ainsi que l'augmentation de TOS et MDA. Enfin, l'augmentation de l'expression génique de NFkB et TNF alpha et de la concentration hépatique en TNF alpha indique une réponse inflammatoire.	Le GT a identifié plusieurs limitations dans ces études notamment l'absence d'approche quantitative pour les études histologiques ainsi que des schémas de traitement proposant une seule dose.

Mortensen *et al.* (2022)	Des rats nouveaux nés ont été exposés à du P25 (21 nm) à une dose de 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 4 jours au cours de différents stades de croissance. Ainsi, 3 groupes de rats ont été exposés pendant les 3 fenêtres post natales J2 à J5, J7 à J10 ou J17 à J20. Une augmentation du poids relatif du cerveau a été observée chez les mâles du groupe J 7-10 ainsi qu'une diminution de la fréquence cardiaque chez les femelles des groupes J 7-10 et J 17-20. Une réponse réduite est observée dans le test des réflexes chez les femelles du groupe J 2-5 ainsi qu'une modulation des performances locomotrices chez les femelles (groupes J 7-10) et les mâles (groupe J 17-20). Les auteurs ont également observé une modulation des niveaux de neurotransmetteurs catécholaminergiques (dopamine, noradrénaline) mais pas des récepteurs sérotoninergiques, dans le cerveau des mâles et des femelles dans les groupes J 7-10 et 17-20. La biosynthèse et le métabolisme des acides aminés et la biosynthèse de l'aminoacyl-ARNt sont dominants parmi les voies métaboliques perturbées.	Le GT note que cette étude repose sur l'emploi d'une dose unique.
Murugadoss *et al.* (2020)	Des souris ont été exposées à du nanoTiO_2 (17 et 117 nm) par gavage. Le manque de précisions relatives au protocole expérimental ne permet pas d'identifier clairement les niveaux de doses testés (environ 50 mg par souris). Les auteurs ont observé une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN sur les cellules sanguines (leucocytes) après une unique administration (présumé par le GT). Les fragmentations de l'ADN sont plus importantes lorsque les particules de 17 nm forment de petits agrégats et celles de 117 nm de gros agrégats.	Le GT note que le schéma de traitement des animaux n'est pas correctement décrit, notamment concernant les niveaux de doses.
Nie *et al.* (2021)	Des rats ont été exposés à du nanoTiO_2 (33 nm) par gavage pendant 7 jours à une dose de 150 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs ont observé : du titane dans le foie (par ICPMS), une désorganisation et une dégénérescence des hépatocytes, des modulations de différents paramètres sériques pouvant traduire une altération hépatique, une augmentation des globules blancs et des neutrophiles, une diminution du gain de poids corporel ainsi qu'une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant. Le poids relatif des organes est quant à lui inchangé.	Le GT note : que le schéma de traitement repose sur une dose unique, un manque d'information sur les performances analytiques (LOD, LOQ), l'absence de scoring et un nombre d'animaux non précisés pour l'histopathologie.
Pinget *et al.* (2019)	Des souris ont été exposées à du E 171 (30-300 nm, anatase) dans l'eau de boisson à des doses de 2, 10 et 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 28 jours. Les auteurs n'ont pas observé de modifications relatives a : la résistance transépithéliale, l'expression des gènes Tjp1 codant pour des protéines de jonctions serrées, la perméabilité paracellulaire. Néanmoins, les auteurs soulignent la diminution de l'expression du gène Muc2 impliqué dans la synthèse de mucines mais ne confirment pas l'altération potentielle du mucus après l'observation d'autres marqueurs. Une diminution de la hauteur des cryptes intestinales (faible à 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}), une légère modification dans l'abondance de certaines espèces bactériennes dans le côlon et une	

	diminution d'activité métabolique du microbiote sont également évoqués. Des augmentations des niveaux de cytokines pro et anti-inflammatoires au niveau du côlon ont également été observées (de manière dose dépendante) à partir de 2 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}, ainsi qu'une augmentation de l'infiltration de macrophages et de lymphocytes CD8+ au niveau du côlon.	
Proquin *et al.* (2018 a,b,c)	Les trois publications de Proquin (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). 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 une étude précédente (UrrutiaOrtega et al. 2016). Dans un premier temps, le E171 (5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}), 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	L'Anses soulignait dans son avis en 2019 que l'étude 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.

	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.	
Shukla *et al.* (2014)	Des souris ont été exposées par gavage pendant 14 jours aux doses de 10, 50 et 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}de nanoTiO_2 (20-50 nm, anatase). Le test des comètes révèle une augmentation statistiquement significative et dose-dépendante du %Tail DNA avec et sans Fpg aux doses de 50 et 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Une augmentation statistiquement significative de la fréquence des micronoyaux a été observée uniquement à la plus forte dose (100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}). L'analyse immunoblot des protéines du foie des souris traitées a montré un changement significatif dans l'expression des protéines de stress, des protéines suppressives de tumeurs et des protéines pro- et anti-apoptotiques. L'expression des protéines de choc thermique (Hsps) a été significativement induite par rapport au contrôle à 10, 50 et 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Une augmentation significative dose-dépendante de l'expression de la protéine suppresseur de tumeur p53, de la protéine proapoptotique Bax et de la caspase-3 et caspase-9 activée, avec une diminution concomitante des niveaux de la protéine antiapoptotique Bcl-2 sont observées. Les niveaux de malondialdéhyde dans les cellules hépatiques sont significativement augmentés à 50 et 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} et une augmentation statistiquement significative du niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) a été observée chez les souris traitées aux 2 doses fortes (50 et 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}). Une augmentation statistiquement significative des niveaux d'AST est observée à la dose de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Aucune induction significative des taux de PAL, d'ALT et de bilirubine totale aux doses de 10, 50 et 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Accumulation de cellules mononucléaires à proximité des sinusoïdes et des angiectasies (espaces sinusoïdaux dilatés, bordés de cellules endothéliales normales et contenant de nombreuses cellules	Concernant le test des comètes, le GT n'est pas en mesure de se positionner clairement sur de potentiels effets cytotoxiques : résultats contradictoires entre l'histopathologie (absence d'apoptose/nécrose) et les biomarqueurs sériques indiquant une probable altération des hépatocytes. Cependant, l'augmentation des effets en présence de FpG pourrait souligner la présence de mécanismes autres que l'apoptose/nécrose.

	sanguines) dans la section du foie de souris exposées à 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Aucune lésion histopathologique significative n'a été observée aux doses plus faibles (10 et 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}).	
Sofranko *et al.* (2021)	Des souris ont été exposées à du P25 pendant 28 jours à une dose de 1% en masse dans l'aliment. Les auteurs se sont principalement intéressés aux effets relatifs à la neuro-inflammation, aux fonctions motrices, à l'apprentissage et à la mémoire selon la ligne directrice OCDE TG 424. Aucun effet sur le poids des organes n'est rapporté (le GT note l'absence d'information relative au poids relatif du cerveau). Aucun effet sur l'intégrité des astrocytes n'est observé. L'absence de neuro inflammation est suggérée par l'absence de modulation des niveaux d'expression de certains biomarqueurs (GFAP, Iba-1) et de cytokines (TNF-α, IL6 et IL1β) recherchés dans le cerveau. Les auteurs ne relèvent pas de modifications relatives aux protéines impliquées dans la cohésion et la structure des cellules endothéliales microvasculaires du cerveau (claudine, occludine, ZO-1) suggérant le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Aucun effet n'est observé sur la fonction motrice, l'apprentissage et la mémoire durant la période de traitement ni même après 14 jours de récupération des animaux. Les auteurs concluent à l'absence d'effet cérébral lié au traitement. Néanmoins, les auteurs n'excluent pas des effets possibles à plus long terme, notamment en cas d'accumulation dans le cerveau, après exposition à d'autres formes de nanoTiO_2 comme le E171, ou selon une autre modalité d'administration par voie orale (eau de boisson, gavage vs prise d'aliment solide) qui pourrait entraîner des différences majeures dans la cinétique d'exposition et donc de potentiels effets associés différents.	Le GT note que cette étude repose sur l'utilisation d'une dose unique et que le dosage du titane dans le tissu cérébral est absent.
Sycheva *et al.* (2011)	Des souris mâles ont été exposées par gavage pendant 7 jours aux doses de 40, 200 et 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} de nano (33 nm, anatase) ou microTiO_2 (160 nm, anatase). Concernant le test des comètes, le nanoTiO_2 a augmenté le taux de fragmentation de l'ADN (% moyens d'ADN dans la queue de la comète en électrophorèse) dans la moelle osseuse et le foie. Aucun effet significatif n'a été observé vis-à-vis des cellules du cerveau. Les microparticules de TiO_2 ont augmenté de façon statistiquement significative le taux de fragmentation de l'ADN dans les cellules de la moelle osseuse mais pas dans les cellules du foie et du cerveau. Concernant le test du micronoyau, les résultats sont négatifs sur cellules de l'estomac, du colon, de la moelle osseuse et spermatides avec le nanoTiO_2. Avec le microTiO_2, une augmentation statistiquement significative de la fréquence d'érythrocytes polychromatiques micronucléés a été observée à la dose maximale de 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} vis-à-vis de la moelle osseuse mais aucune induction significative de la fréquence de micronoyaux, de protubérances nucléaires ou de noyaux atypiques n'a été notée dans les	Concernant le test des comètes, le GT note: l'absence de données permettant d'exclure un effet cytotoxique, l'absence de contrôle positif ,100 cellules analysées au lieu de 150, la dose maximale testée n'est pas justifiée, le prélèvement des organes est effectué 24h après la dernière administration au lieu des 2 à 6h recommandés, pas de preuve d'exposition des cellules. Concernant le test du micronoyau, le GT note: l'absence de données sur le taux de prolifération cellulaire, 1000 érythrocytes analysés au lieu de 4000.

	cellules épithéliales du préestomac et du côlon, ou vis-à-vis des spermatides.	
Talamini *et al.* (2019)	Du E171 a été administré à des souris par voie orale (à l'aide d'une pipette) pendant 15 jours (3 fois par semaine) à une dose de 5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. D'après les auteurs, la quantité de titane dans le cerveau, le rein et les testicules était inférieure à la limite de quantification et l'augmentation de la concentration en titane n'était pas significative dans les poumons et la rate par rapport au groupe contrôle. Néanmoins, les auteurs ont mis en évidence une augmentation significative de titane par ICPMS dans les tissus du petit et du gros intestin, du foie et de l'estomac. Une modification des niveaux de cytokines circulantes et une augmentation des ions superoxydes ont été observées à 5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Des altérations cellulaires ont également été rapportées chez des souris avec une augmentation de l'infiltration de monocytes et de macrophages au niveau du foie et de l'intestin. Une augmentation de l'expression des gènes codant une cytokine pro-inflammatoire (IL-1B) au niveau du foie et de l'estomac est observée	Le GT note que cette étude repose sur la mise en place d'un schéma de traitement non conventionnel.
Talbot *et al.* (2018)	Les auteurs 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 pc)$^{-1}$ j^{-1} ou pendant 60 jours aux doses de 0,1 et 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} de E171 (et de NM-105). 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 TiO_2 dans le mucus. L'analyse du contenu cæcal 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 TiO_2. Les auteurs notent également l'absence de modification de l'Oglycosylation 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 TiO_2, quel que soit le type de TiO_2. Ces résultats indiquent que les propriétés cohésives et la fonction protectrice du mucus ne semblent pas altérées.	Le GT note des durées d'exposition trop faibles pour mettre en évidence des effets néfastes à long terme.
Tassinari *et al.* (2014)	Les auteurs se sont intéressés aux effets du nanoTiO_2 (20-60 nm, anatase) sur les systèmes endocrinien et reproducteur de rats exposés durant 5 jours à des doses de 1 et 2 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs notent la présence de Ti dans la rate, les glandes surrénales et les ovaires (pas de modification dans la thyroïde et l'utérus). Une apoptose des cellules de la granulosa et une nécrose des cellules du cortex au niveau des ovaires ont été mises en évidence. Une légère atteinte histologique de la thyroïde est observée chez les mâles. Les auteurs indiquent également une augmentation des niveaux de testostérone et de T3 chez les mâles et une diminution de testostérone chez les femelles.	Le GT souligne que le cycle œstral n'est pas précisé et que les temps d'exposition sont trop courts pour mettre en évidence la présence d'effets néfastes à long terme.

Vila *et al.* (2018)	Les auteurs ont étudié la génotoxicité de nanoparticules de TiO_2 de 110 nm sur des cellules Caco-2 non différenciées ou différenciées en entérocytes, exposées pendant 24h à des concentrations variant de 10 à 200 µg/mL. Ces nanoparticules de TiO_2 augmentent le nombre de cassures de l'ADN et/ou des sites alkali-labiles dans le test des comètes uniquement à la plus faible concentration testée (10 µg/mL). Elles n'induisent pas d'augmentation du nombre de sites sensibles à la Fpg dans le test des comètes modifié par ajout de Fpg. Les auteurs concluent à l'absence d'effet génotoxique dans ces conditions d'exposition.	Le GT note des biais méthodologiques (analyse de l'internalisation, utilisation du transwell, nombre de réplicats) et des incohérences entre les résultats et les conclusions des auteurs.
Wang *et al.* (2013)	Des rats mâles de 3 et 8 semaines représentant respectivement des animaux jeunes et adultes (28 animaux au total pour chaque âge) ont été exposés à du nanoTiO_2 (75 nm, anatase) par gavage à doses de 10, 50 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 30 jours consécutifs. Aucune mortalité ni aucune modification sur la prise de poids corporel ni sur le poids relatif de différents organes (foie, rein, rate, testicules, poumons, cerveau) ne sont rapportées sauf pour le cœur à 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} chez les jeunes rats. Les auteurs ont montré la présence de nanoparticules de TiO_2 dans les muqueuses du petit intestin et de l'estomac. Une augmentation du nombre de mastocytes au niveau de l'estomac (pas de modification au niveau intestinal) sans modifier le niveau sérique d'histamine et d'IgE est rapportée. Chez les rats jeunes, le traitement provoque une altération de la fonction hépatique, basée sur les mesures de différents marqueurs sériques, avec un déséquilibre du métabolisme des glycolipides. Ces données sont confirmées en histologie avec la présence d'œdèmes à 50 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}, une dégénérescence hydropique avec vacuolisation, un désordre des travées hépatiques ainsi que le gonflement des cellules périlobulaires. Chez les rats adultes, une diminution de la perméabilité intestinale a été observée. Une faible altération des fonctions hépatique et rénale est rapportée : les paramètres biochimiques sériques ne sont pas modifiés mis à part la diminution de la bilirubine totale à 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} et l'augmentation de l'urée à 50 et 200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. De même, au niveau du foie, la formation d'œdèmes n'est pas observée mais l'infiltration de cellules inflammatoires à 10 et 50 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} est rapportée.	Le GT souligne l'absence d'EDX lors des observations des tissus en microscopie électronique (ne permettant pas de confirmer l'identification élémentaire des particules) ainsi que l'absence d'approche quantitative (scoring) pour les études histologiques.
Wang *et al.* (2019)	Wang *et al.* ont évalué les effets mutagènes de nanoparticules de nanoTiO_2 (anatase) de 5, 15 et <100 nm sur des cellules AL hybrides humain-hamster qui ont été obtenues par fusion de fibroblastes humains avec des cellules CHO-K1 présentant une mutation gly-A. Les auteurs indiquent que ces cellules présentent une sensibilité particulière aux agents mutagènes. Les cellules sont exposées aux nanoTiO_2 soit dans leur état pristine, soit « vieillies » pendant 60 jours (le vieillissement a consisté à laisser les suspensions de nano dans l'eau, à température ambiante pendant 60 jours, ce qui entraîne une agglomération des particules). La génotoxicité est	Le GT note l'absence de méthode quantitative pour évaluer la génotoxicité et un manque de rigueur dans la caractérisation du TiO_2.

	évaluée par le test γ-H2AX, qui détecte les cassures double-brin de l'ADN, sur des cellules AL exposées à 10 µg/mL de nanoTiO_2 pendant 72h. Les auteurs indiquent qu'ils comptent les évènements génotoxiques à partir du nombre de cellules présentant au moins un focus de γ -H2AX, comme décrit dans une publication de référence, mais ne présentent que des images de microscopie à fluorescence montrant les foci. Les auteurs mesurent également le contenu cellulaire de γ -H2AX par western blot, et montrent une augmentation significative de ce contenu dans les cellules exposées aux nanoTiO_2, l'effet étant plus marqué avec les plus petites tailles de nano. A nouveau, il n'y a pas d'effet du vieillissement du nanoTiO_2 sur la génotoxicité. Les auteurs examinent également les mutations du gène CD59 dans les cellules exposées à 10 µg/mL de nanoTiO_2 pendant 72h. Ils observent une augmentation statistiquement significative du nombre de mutants sur le locus CD59 parmi les cellules exposées aux nanoTiO_2, qu'elles soient pristines ou vieillies. Le profil de mutations est différent dans les cellules contrôles (mutation spontanées) par rapport aux cellules exposées aux nanoTiO_2. En effet, les cellules exposées présentant une mutation de CD59 présentent également une fréquence de mutation élevée dans 5 autres loci du chromosome 11, par rapport aux cellules contrôles. Enfin, les auteurs analysent le contenu intracellulaire en espèces réactives de l'oxygène et quelques marqueurs d'apoptose dans les cellules exposées et relient la survenue de l'apoptose à la génotoxicité des nanoparticules.	
Warheit *et al.* (2015)	Des rats (10 par sexe et par groupe) ont été exposés par gavage à du TiO_2 de 145 nm (21% en nombre de particules < 100 nm) recouvert d'alumine à des doses de 100, 300 et 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 90 jours. Aucun effet toxicologique spécifique associé au nanoTiO_2 recouvert d'alumine n'a été mis en évidence jusqu'à la dose maximale testée de 1000 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Des variations du poids de certains organes et de paramètres biochimiques ont été observés mais considérés comme non significatifs du fait de l'absence d'effet dose-réponse. Toujours dans cette même étude, une étude subchronique de 28 jours utilisant un TiO_2 de 173 nm (11% en nombre de particules < 100 nm) et une étude de toxicité aigüe utilisant un TiO_2 de 73 nm (73% de particules < 100 nm) recouvert d'alumine et de silice n'ont entrainé aucun effet nocif.	Le GT souligne que cette étude repose sur l'utilisation d'un TiO_2 recouvert d'alumine qui n'est pas représentatif des particules de TiO_2 constitutives du E 171.
Yao *et al.* (2020)	Des souris ont été exposées à du nanoTiO_2 (22 nm) par gavage à des doses de 300 et 1200 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} pendant 28 jours. Les auteurs rapportent une augmentation de la concentration en titane dans les tissus de l'iléon, une réduction de la taille des villosités intestinales et des dommages de l'épithélium au niveau de l'iléon. Une augmentation de l'expression des gènes codant des protéines de jonctions serrées intestinales a été observée ainsi qu'une dérégulation des gènes impliqués dans la différenciation des	Le GT note que cette étude repose sur un nombre d'animaux limité (5 animaux par groupe).

	cellules T en Th2. Selon les auteurs, les cytokines sécrétées par des cellules Th2 pourraient conduire à la dégradation des jonctions serrées de l'intestin.	
Yao *et al.* (2021)	Les auteurs ont étudié les effets du nanoTiO_2 sur des rates gestantes et leur descendance. Les rates ont été exposées à une dose de 100 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1} du 1er au 20ème jour de lactation après la naissance des nouveaux nés. Chez les mères, une augmentation de titane est mesurée dans les glandes mammaires et dans le colostrum. La présence de titane n'est plus détectée dans le lait au 19ème jour d'allaitement. Une diminution du taux de lactose est observée dans la composition du lait des mères exposées. Une atteinte histologique est observée au niveau des alvéoles des glandes mammaires sans modification du poids relatif de ces dernières. Chez la descendance, du titane est détecté dans l'estomac et l'intestin. Des modulations hématologiques (hématocrite, hémoglobine) et du poids relatif de certains organes (cœur, foie, poumons, rate et cerveau) sont rapportés. Enfin une réduction de la taille des ratons sans altération de la prise de poids est également mentionnée.	Le GT note que certains résultats sont difficilement interprétables du fait de variations multiparamétriques (les conséquences en termes de croissance et développement d'organes dans la descendance sont difficiles à interpréter, le rapport poids d'organes sur poids corporel varient entre augmentation et diminution selon le temps d'exposition au TiO_2 des mères et l'organe considéré).
Zhang *et al.* (2018)	Des souris ont été exposées par gavage, durant la période de gestation (13 premiers jours), à des doses de 1 et 10 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs évoquent la présence de particules de TiO_2 dans les cellules du placenta, une diminution du poids relatif et des atteintes structurales du placenta. Des diminutions de l'expression de gènes de la fonction placentaire (contrôle de la différenciation cellulaire du trophoblaste et de son homéostasie, développement du labyrinthe), de la vascularisation fœtale dans le placenta, du nombre de cellules NK (*natural killer*) et de la prolifération cellulaire au niveau du placenta ont été rapportées. Les auteurs notent également une activation dose-dépendante de l'apoptose. D'après les auteurs, l'ensemble de ces altérations n'entrainent pas de dégradation de la fonction placentaire ni une diminution de la viabilité des fœtus.	Le GT souligne l'absence de scoring pour l'histopathologie, l'absence de précisions relatives aux performances analytiques des techniques utilisées pour quantifier le titane dans les organes ainsi que l'absence d'EDX lors des observations des tissus en microscopie électronique.
Zhang *et al.* (2020)	Des souris ont été exposées par gavage durant 30 jours à du nanoTiO_2 (21 nm) à une dose de 150 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs observent une expression plus forte du marqueur HuC/D dans le système nerveux entérique, ainsi qu'une diminution de l'expression des transcrits de récepteurs à la somatostatine mais pas de variation dans l'expression des neurones sérotoninergiques. Les auteurs rapportent également une inhibition de l'activité locomotrice (test open field) mais pas de trouble de la mémoire (water maze). Aucun effet sur le tissu cérébral n'est observé.	Le GT note : que le nombre de répétitions analytiques n'est pas précisé, des manques de clarté sur le protocole expérimental, des interprétations erronées (excitation anormale des neurones entériques) ainsi que l'usage d'une dose unique.
Zhang *et al.* (2021)	Dans cette étude réalisée chez la souris adulte, les auteurs ont utilisé deux formes de particules de TiO_2, nanométriques (33 nm, anatase) et micrométriques (124nm, rutile). Les deux formes de TiO_2 ont été ajoutées à 1% de la matrice alimentaire et les animaux exposés pendant 1, 3 et 6 mois. En fin de traitement, les animaux ont reçu ou non (contrôles) une dose	Le GT souligne l'absence de précisions relatives aux performances analytiques (LOD ou LOQ) des techniques utilisées pour quantifier le titane dans les organes ainsi que l'absence d'EDX lors des observations des tissus en microscopie électronique. Le GT note également des incohérences et l'absence de corrélation

	unique de lipopolysaccharide (LPS à 10 mg (kg pc)$^{-1}$, un composant proinflammatoire issu de la paroi de bactéries Gram-négatives). Les auteurs ont conclu à l'absence d'effet sur la prise de poids des souris et sur leur prise alimentaire à 1, 3 ou 6 mois de traitement, excepté à la 7ème semaine de traitement au nanoTiO_2. Des particules denses aux électrons (par MET) ont été retrouvées dans des cellules épithéliales de l'intestin. Dans le sang, une augmentation de la concentration circulante de Titane dans le groupe exposé au microTiO_2 est apparue après 6 mois de traitement, quand l'absence de résultat équivalent avec le nanoTiO_2 a été attribuée à la baisse de la prise alimentaire dans ce groupe de souris. Une augmentation du ratio hauteur des villosités/profondeur des cryptes est observés avec le nanoTiO_2. Une diminution de la perméabilité est observée dans le groupe exposé au TiO_2 et aux LPS. Cette diminution n'est pas observée après exposition avec du TiO_2 seul ou des LPS seul. Les LPS étant connus pour entraîner des réponses inflammatoires et délétères au niveau de la barrière intestinale, l'absence de modification de perméabilité intestinale dans le groupe LPS seul est un résultat surprenant. L'exposition aux 2 formes de TiO_2 n'a pas entraîné de lésions tissulaires, d'infiltrations cellulaires ni de modifications des niveaux de cytokines.	entre les paramètres mesurés (perméabilité intestinale, l'absence de réponse (évidente et attendue) délétère du LPS.
Zhou *et al.* (2019)	Les auteurs se sont intéressés au neuro-développement de la descendance issue de souris femelles exposées à du nanoTiO_2 au cours de la phase de gestation et de lactation à des doses de 1,25 ; 2,5 et 5 mg (kg pc)$^{-1}$ j^{-1}. Les auteurs observent une augmentation de titane dans l'hippocampe, des changements histologiques (apoptose, nécrose, œdèmes) au niveau de l'hippocampe, une diminution de la longueur des filaments dendritiques et une modulation de l'expression de marqueurs impliqués dans la structure cellulaire de l'hippocampe.	Le GT note : des incohérences concernant le protocole expérimental (durée d'isolement, période du sacrifice des nouveaux nés), l'analyse histologique est menée sur un seul individu, le sexe des nouveaux nés n'est pas précisé.